

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2005 年 7 月 14 日 (14.07.2005)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2005/063612 A1

(51) 国際特許分類: **B81B 1/00**, B29C 33/38, B81C 1/00, B82B 1/00, 3/00, H01L 21/027

(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/019116

(22) 国際出願日: 2004 年 12 月 21 日 (21.12.2004)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願 2003-431801  
2003 年 12 月 26 日 (26.12.2003) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社日立製作所 (HITACHI, LTD.) [JP/JP]; 〒1008280 東京都千代田区丸の内一丁目 6 番 6 号 Tokyo (JP).

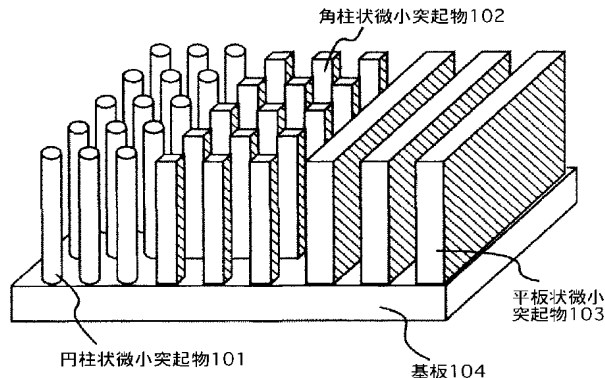
(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 吉田 博史 (YOSHIDA, Hiroshi) [JP/JP]; 〒3191221 茨城県日立市大みか町七丁目 1 番 1 号 株式会社日立製作所日立研究所内 Ibaraki (JP). 赤星 晴夫 (AKAHOSHI, Haruo) [JP/JP]; 〒3191221 茨城県日立市大みか町七丁目 1 番 1 号 株式会社日立製作所日立研究所内 Ibaraki (JP). 宮内 昭浩 (MIYAUCHI, Akihiro) [JP/JP]; 〒3191221 茨城県日立市大みか町七丁目 1 番 1 号 株式会社日立製作所日立研究所内 Ibaraki (JP). 荻野 雅彦 (OGINO, Masahiko) [JP/JP]; 〒3191221 茨城県日立市大みか町七丁目 1 番 1 号 株式会社日立製作所日立研究所内 Ibaraki (JP).

[続葉有]

(54) Title: FINE METAL STRUCTURE, PROCESS FOR PRODUCING THE SAME, FINE METAL MOLD AND DEVICE

(54) 発明の名称: 微細金属構造体とその製造方法、並びに微細金型とデバイス



101 CYLINDRICAL MICROPROJECTION  
102 RECTANGULAR COLUMN SHAPED MICROPROJECTION  
103 TABULAR MICROPROJECTION  
104 SUBSTRATE

(57) Abstract: A fine metal structure having its surface furnished with microprojections of high strength, high precision and large aspect ratio; and a process for producing the fine metal structure free of defects. There is provided a fine metal structure having its surface furnished with microprojections, characterized in that the microprojections have a minimum thickness or minimum diameter ranging from 10 nanometers to 10 micrometers and that the ratio between minimum thickness or minimum diameter (D) of microprojections and height of microprojections (H), H/D, is greater than 1. There is further provided a process for producing a fine metal structure, characterized by comprising providing a substrate having a fine rugged pattern on its surface, applying a molecular electroless plating catalyst to the surface, thereafter carrying out electroless plating to thereby form a metal layer having the rugged pattern filled, and detaching the metal layer from the substrate to thereby obtain a fine metal structure furnished with a surface having undergone reversal transfer of the above rugged pattern.

(57) 要約: 表面に、高強度で精度が高くアスペクト比の大きな微小突起物を有する、微細金属構造体および前記微細構造体を欠陥無く製造する方法を提供することを課題とする。表面に微小突起物を有する微細金属構造体において、微小突起物の最小厚みあるいは最小直径が10ナノメートルから10マイクロメートルであり、前記微小突起物の高さ(H)に対する、前記微小突起物の最小厚みあるいは最小直径(D)の比(H/D)

[続葉有]

WO 2005/063612 A1



(74) 代理人: 浅村 皓, 外(ASAMURA, Kiyoshi et al.); 〒1000004 東京都千代田区大手町2丁目2番1号 新大手町ビル331 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

D) が1より大きいことを特徴とする。また、表面に微細な凸凹パターンを有する基板の表面に、分子性無電解めっき触媒を付与し、その後に無電解めっきを施すことにより少なくとも前記凸凹パターンが充填された金属層を形成し、さらに、前記金属層を前記基板から剥離することにより前記凸凹パターンが反転転写された表面を有する微細金属構造体を得ることを特徴とする。

## 明 細 書

### 微細金属構造体とその製造方法、並びに微細金型とデバイス 技術分野

[0001] 本発明は、表面に微小突起物を有する微細構造体およびその製造方法に関する。また、本発明は、上記微細構造体を用いた装置とデバイス、特に樹脂や無機物を加圧成形するナノインプリントに用いる微細金型およびナノインプリント装置、電気化学反応により物質を変換、製造あるいは検出するための電極、マイクロチップおよびDNAチップに関する。

### 背景技術

[0002] 以下、従来一般的に適用されている表面に微小突起物を有する微細構造体およびその製造方法を詳述する。

[0003] まず、第一の表面に微小突起物を有する微細構造体およびその製造方法は、シリコン等の無機物やニッケル等の金属、あるいはポリスチレンやレジスト等の有機物を、マスクを用いたリソグラフィーや異方エッチング等の微細加工技術により直接加工し、得られた加工品を直接、金型やマイクロデバイス等の部材として用いるものである(特許文献1参照)。

[0004] 第二の表面に微小突起物を有する微細構造体およびその製造方法は、上述の第一の従来技術と同様の方法で形成した微細構造体を金型として、ポリスチレン等の樹脂を加圧成型した後に、成型品を金型から剥離し微細構造体として利用するものである(特許文献2参照)。

[0005] 第三の表面に微小突起物を有する微細構造体およびその製造方法は、第一の従来技術と同様の方法で形成した微細構造体を鋳型として、その内部を電気めっきにより埋め込み、その後、得られためっき膜を鋳型から剥離し微細構造体として利用するものである(特許文献3参照)。

[0006] また、第三の方法に関し、スタンプの表面に高い硬度が要求されるような場合には、NiPによる無電解めっきのみでスタンプを作製し、得られたスタンプを400℃程度の温度で4時間熱処理することにより、HV硬度を1000以上にすることができることが

開示されている(特許文献4参照)。

[0007] 特許文献1:特開2002-307398号公報

特許文献2:米国特許5,772,905号公報

特許文献3:特許第2633088号公報

特許文献4:特開2003-22585号公報([0040]段落)

## 発明の開示

### 発明が解決しようとする課題

[0008] 特許文献1に記載の方法により得られる微細構造体は一般的に高精度であり、また金属やシリコン等を用いた場合十分な強度を有することがある。しかしながら、多数の工程を必要とする微細加工により直接部材を形成するため製造コストが高く、安価な部材を大量に量産する工程に適用することは困難である。

[0009] 特許文献2に記載の手法は、一般的にナノインプリント技術と総称されている手法であり、第一の方法で形成した微細構造体の形状を低コストで複製し微細構造を有する部材を製造できる。しかしながら、加圧成型により微細構造体を製造するため、微細構造体として用いる材料は比較的強度の低い材料に限られ、得られた微細構造体の強度および信頼性が低いことが懸念される。さらに、成型品を金型から離型する場合に、成型品が変形する場合があり、得られた微細構造体の精度にも問題が存在する。

[0010] 特許文献3に記載の手法は電鋳と称され、デジタルビデオディスク製造に用いるスタンパの製造等に適用されている。本手法によると、アスペクト比の大きな微小突起物を本手法により製造するためには、微細で深い穴やトレンチ状の形状を有する鋳型内部を電気めっき法により埋め込む必要があがる。しかしながら、微細で深い穴やトレンチ状の形状の中心部にボイドやシーム等の欠陥を形成することなく完全に微細で深い形状を埋め込むことは困難である。さらに、電気めっき法により得られる金属は、一般的にその強度が低く、そのため、得られる微細構造体の信頼性に問題点を有する場合があるだけでなく、アスペクト比の大きな微小突起物を作成する場合、鋳型からめっき膜を剥離する際、微小突起物が破損する場合がある。

[0011] 特許文献4に記載の手法では、硬度を高くできることが記載されているが、微細で

深い穴やトレンチ状の形状を有する鋳型内部へボイドやシーム等の欠陥を形成することなく完全に微細で深い形状を埋め込む手法については、具体的に開示されていない。

[0012] 以上のように、従来の技術では、表面に高強度で精度が高くアスペクト比の大きな微小突起物を有する微細金属構造体、および微細構造体を欠陥無く製造する方法を提供することは困難である。

[0013] 本発明の目的は、表面に高強度で精度が高くアスペクト比の大きな微小突起物を有する微細金属構造体、および前記微細構造体を欠陥無く製造する方法を提供することにある。

[0014] また、本発明のさらなる目的は、前記微細金属構造体を用い、高精度で信頼の高い装置やデバイス、特に樹脂や無機物を加圧成形するナノインプリントに用いる微細金型およびナノインプリント装置、電気化学反応により物質を変換、製造あるいは検出するための電極、マイクロチップおよびDNAチップを提供することである。

#### 課題を解決するための手段

[0015] 本発明は上記課題を解決するためになされたものであり、表面に微小突起物を有する微細金属構造体にあつて、厚みあるいは相当直径が10ナノメートルから10マイクロメートルであり、アスペクト比が1より大きい微小突起物を有していることを特徴とする。ここで、アスペクト比とは、微小突起物の高さ(H)に対する、前記微小突起物の厚みあるいは相当直径(D)の比( $H/D$ )で定義される値である。なお、相当直径という語を用いたのは、微小突起物の断面が必ずしも円形ではなく、楕円、多角形、非対称形などの場合があるためで、本発明ではこれらを全て包含するために相当直径を用いている。また、本発明において、微小突起物の厚みは、微小突起物の断面が長方形などのように細長い形状の場合に、その厚みの薄い部分の長さとする。また、微小突起物が、非金属元素を副成分とする合金であることを特徴とする。

[0016] また、微細な凹凸パターンを有する基板の表面に分子性無電解触媒を付与し、無電解めっきにより形成された金属層を該基板から剥離し該凹凸パターンを反転転写することにより得られた微細金属構造体であること特徴とする。

[0017] また、目的に応じて、微小突起物の表面の少なくとも一部分が、少なくとも一層の被

覆層により被覆されていてもよい。また、微小突起物の表面に直接あるいは間接的に抗原、抗体、タンパク、塩基、糖鎖及び離型剤等の表面改質のための表面改質剤のうち少なくとも一種類の有機物が固定化されていてもよい。

- [0018] また、微細金属構造体の製造方法として、表面に微細な凸凹パターンを有する基板の表面に、分子性無電解めっき触媒を付与し、その後に無電解めっきを施すことにより少なくとも前記凸凹パターンが充填された金属層を形成し、さらに、前記金属層を前記基板から剥離することにより前記凸凹パターンが反転転写された表面を有する微細金属構造体を得ることを特徴とする。

本発明の他の目的、特徴及び利点は添付図面に関する以下の本発明の実施例の記載から明らかになるであろう。

#### 発明の効果

- [0019] 本発明を用いると、表面に、高強度で精度が高くアスペクト比の大きな微小突起物を有する、微細金属構造体および前記微細構造体を欠陥無く製造する方法を提供できる。また、上記微細構造体を用い高精度で高信頼性の装置あるいはデバイス、特に樹脂や無機物を加圧成形するナノインプリントに用いる微細金型およびナノインプリント装置、電気化学反応により物質を変換、製造あるいは検出するための電極、マイクロチップおよびDNAチップを提供することが可能となる。

#### 発明を実施するための最良の形態

- [0020] 本発明者らは上記課題を解決するために鋭意検討を行った結果、表面に非金属元素を副成分とする金属合金からなる微小突起物を形成した微細金属構造体を発明するに至った。さらに、微細な凸凹パターンを有する基板の表面に、分子性無電解めっき触媒を付与し、その後に無電解めっきを施すことにより、少なくとも前記凸凹パターンが充填された金属層を形成し、さらに、前記金属層を前記基板から剥離することにより前記凸凹パターンが反転転写された表面を有する微細金属構造体を欠陥無く製造することができることを見出し、本発明を完成するに至った。

- [0021] さらに、本発明者らは、上記微細金属構造体およびその製造方法を応用し、高強度で耐久性に優れた高精度のナノインプリント用微細金型やナノインプリント装置を完成するに至った。また、上記微細金属構造体の表面を有機物、無機物あるいは金

属からなる層で被覆し、高性能な電極、マイクロチップおよびDNAチップを完成するに至った。特に、上記微細金属構造体の表面を金で被覆し、さらに、その表面に生体由来物質、特に抗原・抗体、タンパク、塩基、糖鎖を固定化できることを見出し、マイクロチップへ応用することで耐久性に優れた各種デバイスを安価に量産することができることを見出し、本発明を完成するに至った。

[0022] 図1に本発明において完成した、表面に微小突起物を有する微細金属構造体の形状の例を模式的に示す。本発明において微小突起物は円柱状101、角柱状102、平板状103等の形状を有している。微細金属構造体はこれらの微小突起物が基板104表面に一種または複数種類の形状で配列した構造あるいは分布した構造を有する。また、本発明は、微小突起物が基板表面から突出した形状のみではなく、基板表面に微小トレンチあるいは微小孔等の凹状構造を有する微細金属構造体や、基板表面に微小突起物と微小トレンチあるいは微小孔が混在するものも含有する。本発明において得られる微小金属構造体は、微粒子や生物由来分子等を物理的・化学的に吸着あるいは選別する用途や、フォトリソバンドギャップ現象や散乱、屈折、電子放出等の原理を応用して光デバイス等に用いることが可能である。また、平坦な表面と比較し、本発明において完成した微細構造体表面の表面積は非常に大きくなることから、高感度の電極やDNAチップ等の基板に適用することが可能である。そのため、微小突起物の大きさは、最小厚みあるいは最小直径が10ナノメートルから10マイクロメートルであることが望ましい。また、微小突起物の高さ(H)に対する、前記微小突起物の最小厚みあるいは最小直径(D)の比(H/D)が1より大きいことが望ましい。

[0023] 我々は、表面に、高強度で、かつ、アスペクト比の大きな微小突起物を有する微小金属構造体を構築するためには、非金属元素、特に、リンまたはホウ素を副成分として含有する金属合金で微細構造体を構築すると良いことを見出した。この種の金属合金としてはニッケルを主成分としたニッケルリン合金やニッケルホウ素合金が高強度で特に望ましが、特定の元素である必要はなく、コバルトやその他の金属を主成分とする合金や、さらに多種の金属からなる合金であっても良い。これらの合金は、その主成分のみからなる純金属より一般的に強度が高い。これは、リンやホウ素等の非金

属元素が合金中で偏析するためであると考えられている。今回、我々は、この偏析が、微細な構造中では特に有効であることを見出して本発明を完成するに至った。この理由としては現時点では明確ではないが、微細な構造中における非金属元素の偏析構造がバルク中のそれとは異なっていることが一因であると考えられる。ここで、金属合金中に含まれる非金属元素の濃度は特に規定するものではないが、一般的に非金属元素がリンの場合2重量%から15重量%、非金属元素がホウ素の場合0.1重量%から8重量%の範囲内であることが得られる微細金属構造体の強度の点で望ましい。非金属元素の濃度が上記濃度範囲より小さい場合、十分な強度向上効果が認められない。また非金属元素の濃度が上記濃度範囲より大きい場合、得られる金属微細構造体が脆化し実用に供することが困難となる。

[0024] このように、非金属元素、特にリンまたはホウ素を副成分として含有する金属合金で構築した微細構造体は優れた強度を示し、特に、微細金属構造体表面に存在する微小突起物が微細柱状構造からなり、その柱状構造の高さ(H)に対する直径あるいは一辺の長さ(D)の比(H/D)が1より大きい構造、つまり細く高い構造を構築した場合において特に、優れた特性を示す。従来、これらの細く高い微細突起物を樹脂または金属で作成した場合、その強度が低く、例えば、微細金属構造体をナノインプリント用の微細金型として用いた場合には数回の使用で破損し、また、微細構造体をDNAチップの基板として適用した場合、DNA溶液のスポンティング時に微小構造表面の微小突起物の破損が観察されたが、本発明を適用した場合、そのような不具合が発現する頻度は大幅に削減された。

[0025] 次に、表面に微小突起物を有する微細金属構造体を、欠陥無く製造する方法について図2を用いて説明する。本製造方法は、微細な凸凹パターンを有する微細鋳型201表面に、分子性無電解めっき触媒を付与することにより分子性無電解めっき触媒層202を付与し、前記型201を無電解めっき液に浸漬することにより、微細鋳型201表面に存在する凸凹形状を完全に無電解めっき膜203により充填し、その後に、無電解めっき膜203を微細鋳型201から剥離することにより凸凹パターンが反転転写された微細金属構造体を製造することを特徴とする。本製造方法を適用すると、高強度で精度の高いのアスペクト比の大きな微小突起物を表面に有する微細金属構造



体を欠陥なく量産できる。なお、微細鑄型201からめっき膜203を剥離する際、めっき膜203そのものを剥離しても良いが、めっき膜203の強度を向上させ、取り扱いを簡便にする目的で、めっき膜の裏面に支持層204を積層することが望ましい。ここで、支持層204の材質は特に限定するものではなく、ニッケル、銅等の金属、ガラス、酸化チタン等の無機物、ポリスチレン、ポリエチレンテレフタレート等の有機物等を用いることができる。また、支持層204の製膜方法としては、電気めっき法、スパッタ法、ゾルゲル法、溶媒キャスト法等、支持膜の材質に応じて適宜選択できる。また、図2(e)においては微細鑄型201からめっき膜203を剥離する際、分子性無電解めっき触媒層が無電解めっき膜203とともに微細鑄型201から剥離されるよう図示した。しかしながら、分子性無電解めっき触媒層202は、鑄型からの剥離時、その一部または全部が微細鑄型201の表面に残留し、もって、剥離後の無電解めっき膜203表面が分子性無電解めっき触媒層で被覆されていない部分があってもよい。

[0026] 本製造方法を適用した場合、無電解めっきに用いる還元剤や添加剤の選択により、リンまたはホウ素等の非金属元素を無電解めっき膜203中に析出させることが可能であり、高強度の微細金属構造体を製造することができる。これは、本製造方法の大きな特徴であり、従来用いられている電鑄法の問題点を大きく改善できる点である。なお、無電解めっき膜の主成分はニッケル、金、銀、白金、パラジウム、コバルト、スズ、銅等が挙げられ、特に限定するものではないが、得られる微細構造体の強度の点から、ニッケルを主成分とすることが望ましい。

[0027] また、本製造方法のさらなる特徴としては、従来用いられている電鑄法では一般的に製造することが困難な、アスペクト比が大きな形状を有する微小突起物を簡便に製造できる点が上げられる。アスペクト比が大きな形状を有する微小突起物を製造する場合、深い凹形状を有する鑄型内に金属を析出させ、凹形状を埋め込む必要がある。この際、電鑄法では以下の2点の問題点が存在し高品質な微細構造体を製造することが困難である。まず、1点目は電鑄法においては、電気めっき法により鑄型内を充填するため、電気めっきに先立ち、微細鑄型表面に給電層を形成する必要がある。給電層作成には一般的にスパッタや蒸着等の手法が適用されるが、深い凹形状を有する微細金型内に均一に給電層を形成することは困難である。さらに、2点目とし

て、電気めっき法を用いた場合、凹形状底部周辺に比べて、凹形状表面近傍でより速くめっき膜の析出が起こり、その結果、凹形状内部が完全に充填される前に、凹形状表面近傍に析出しためっき膜で凹形状が閉じてしまう。その結果、得られる微小突起物内部にボイドやシームが生成し高品質な微小金属構造体を得ることができない。

[0028] 我々は、上記問題点を解決するため、めっき膜が均一に成長する特徴を有すると考えられている無電解めっき法により凹形状内部を充填する検討を行った。その結果、無電解めっき反応の起点となる触媒として、通常用いられているコロイド状の触媒ではなく、触媒原子が錯体あるいは塩の状態で溶液中に溶解した分子性無電解めっき触媒を用いた場合にのみ深い凹形状を欠陥なく充填し、微細で高アスペクトな金属微細構造体を高精度に製造できることを見出し、本発明を達成するに至った。

[0029] 以下、上記現象が発現する理由を、凹形状内部に付与された触媒を基点としためっき成長過程の観点から推定した結果を図3を用いて詳述する。まず、図3(a)に通常一般的に用いられるコロイド状無電解めっき用触媒液に表面に微細な凸凹形状を有する基板を浸漬することによりコロイド状触媒粒子301を付与した微細鑄型の凹形状部分302を拡大した模式図を示す。コロイド状触媒粒子301は物理的吸着あるいは化学的吸着により凹形状内部表面に吸着する。ここで、コロイド状触媒粒子301の粒径は触媒を付与する凹形状の空隙の大きさより十分小さいことが必要なのは述べるまでもないが、粒径が十分小さな粒子を用いた場合においても、凹形状内部には触媒粒子が離散的に吸着した状態となる。この状態で微細金型を無電解めっき液に導入し、めっき反応を開始すると、図3

(b)に模式的に図示するように、めっき膜303はコロイド状触媒粒子301を中心として一定の析出速度で成長する。そのため、凹内部が完全にめっき膜により充填する以前に、図3(c)に模式的に図示するように、一部で触媒を中心として成長しためっき膜が接触し凹形状が詰まった状態になる場合がある。このような現象は凹形状が深く細い場合において特に顕著に発現し、凹内部にボイドやシーム等の欠陥304が生じる。

[0030] 他方、図3(d)に示すように、分子性触媒を用いた場合、凹内部に触媒分子が均一

に吸着した分子性触媒層305が形成する。そのため、図3(e)および図3(f)に模式的図示するように、触媒を中心として成長するめっき膜303は凹内部表面に対してほぼ平行に均一に成長し、その結果、コロイド状触媒を用いた場合に欠陥無く充填することが困難な、深く細い凹形状もボイドやシーム等の欠陥無く充填することが可能となる。

[0031] 本発明により得られる高アスペクト比の金属微細構造体はその強度、精度および形状からナノインプリントに用いる微細金型、電気化学反応により物質を変換・製造あるいは検出するための電極、DNAチップや免疫分析チップ等の各種バイオデバイス、MEMS、光または磁気ストレージ、導波路や回折格子等の光デバイス、フォトニック結晶、FEDディスプレイ等に用いる電子放出源等、種々の製品、デバイス、部品等に広く適用することが可能である。その際、上述した金属微細構造体およびその製造方法をそのままの形で適用しても良いが、より好ましくは、目的に応じて金属微細構造体の表面を有機物、無機物あるいは金属等で被覆して用いることが適当である。被覆に用いる有機物、無機物あるいは金属等を限定するものではないが、例えば、微細成形体を電極等として用いる場合には金、銀、白金、金属等を、微細金型として用いる場合にはフッ素系の離型剤等その利用目的に応じて選択することが適当である。

[0032] さらに、本発明でなされた微細構造体を生体分子や微量化学物質等の物質の検出や分離に用いるマイクロチップやセンサ等に適用する場合においては、検出や分離の対象物質と相互作用を及ぼし合う、抗原、抗体、タンパク、塩基や糖鎖などの生体由来分子や有機分子で被覆するとよい。この場合、微細構造体表面に直接、生体由来分子や有機分子を物理吸着等の手法により被覆しても良いが、より望ましくは、化学結合を用いて固定化の方が望ましい。微細構造体表面に生体分子や有機分子を化学的に固定する方法としては例えばシランカップリングや金-チオール結合が適用できる。特に、金-チオール結合は生体由来物質や有機分子を簡便に固定化することができる点で望ましい。すなわち、本発明で得られた微細金属構造体表面に金を被覆し、その後にチオール基を導入した生体由来物質や有機分子と金表面を反応させることにより、微細構造体表面に生体由来物質や有機分子を安定的に導入

することが可能となる。なお、微細構造体表面を金で被覆する際には、置換めつき法を用いると簡便に行うことができ望ましい。

[0033] 以下、本発明の詳細な実施の形態を実施例に基づいて説明する。

### 実施例 1

[0034] 微小ニッケルリン合金構造体

本発明の一実施例として、リンを副成分として含有しニッケルを主成分とした微小金属構造体に関して説明する。図4は本実施例で作製したリンを副成分として含有しニッケルを主成分とした微小金属構造体の表面部分の走査型電子顕微鏡写真を基にした模式図である。微小金属構造体はニッケルを主成分としリンを副成分とする複数の微小柱状突起物401および金属薄膜402から成る。微小柱状突起物401および金属薄膜402は一体であり同一の組成のニッケルリン合金からなる。また、図4には示されていないが、金属薄膜402の裏面には、微小金属構造体を支持するために厚み50マイクロメートルのポリスチレン層が存在する。ここで、微小柱状突起物401の高さは2マイクロメートル、直径は底部で240ナノメートル、先端部で220ナノメートルであり、柱状微小突起物の高さ(H)に対する、最小直径少(D)の比(H/D)であるアスペクト比は $H/D=9.1$ と非常に大きな値となっている。また、微小突起物の中心間距離は480ナノメートルである。

[0035] 上述の微小金属構造体は以下に述べる方法で作製した。図5は微小金属構造体の製造工程である。まず、結晶方位(100)、直径100ミリメートルのシリコンウエハ基板501の表面にレジスト層502を形成し、電子ビームリソグラフィーにより適切なマスクパターン層503を形成し、その後にドライエッチングを行うことによりシリコンウエハ基板501をエッチング加工し、微小金属構造体の表面構造が反転した構造を有する微細鋳型504を作成した。ここで、基板にパターンを形成する方法は特に制限されない。例えば、電子ビームリソグラフィーに替えてフォトリソグラフィー等、所望する加工精度に応じて選択すればよい。また、基板のエッチングもドライエッチングの他、エッチング溶液を用いたウェットエッチング等の手法を適用しても良い。さらに、基板の材料としては、シリコンウエハ、各種金属材料、ガラス、セラミック、プラスチック等、強度と要求される精度の加工性を有するものであれば良い。具体的には、Si, SiC, SiN,

多結晶Si, ガラス, Ni, Cr, Cu、及びこれらを1種以上含むものが好ましく例示される。  
。

[0036] 次に、微細鑄型504表面に無電解めっき用分子性触媒層505を以下に詳述する方法により付与した。まず、微細鑄型504を硫酸／過酸化水素水の70％／30％混合溶液に70℃において30分間浸漬することにより洗浄した。得られた型を純水で十分に洗浄の後、触媒の付与を促進するためのクリーナー溶液(アテックジャパン製セキュリガント902)に30℃において5分間浸漬を用いて型の表面を調整した。次に、得られた微細鑄型502を純水で十分に洗浄し、触媒液の汚染を防止する目的でプレディップ溶液(アテックジャパン社製ネオガントB)に室温で1分間浸漬した。次に、得られた微細鑄型504を触媒溶液(アテックジャパン社製ネオガント834)液に50℃において5分間浸漬することにより、微細鑄型504表面にパラジウムを付与した。ここで用いた触媒はパラジウム錯体分子が溶液中に溶解したタイプであった。触媒付与後、型を純水に浸漬することにより洗浄し、アテックジャパン社製ネオガントW液を用いて付与したパラジウムを核として活性化した。最後に、得られた微細鑄型504を純水で洗浄することにより、分子性触媒層505を付与した微細鑄型504を得た。なお、本実施例ではアテックジャパン社製のパラジウム触媒プロセスを適用したが、用いる触媒は、分子性触媒であれば特に本実施例で適用したものに限定するものではない。

[0037] 次に、触媒の付与を行った微細鑄型504を無電解ニッケルめっき液に浸漬することにより、微細孔内部および型表面にニッケルを主成分とする合金膜506を析出させた。ここで用いた無電解ニッケルめっき液の組成およびめっき条件を表1に示す。本実施例では合金の副成分としてリンを共析させる目的で、還元剤としてホスフィン酸ナトリウムを用いた。なお、めっき液のpHはアンモニア水溶液を用いて調整した。

[0038] (表1)

表1 無電解ニッケルめっき液の組成および条件

塩化ニッケル	$20\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$
次亜リン酸ナトリウム	$20\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$

塩化アンモニウム	$35\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$
クエン酸ナトリウム	$10\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$

---

めっき温度	80℃
めっき液pH	8.5
めっき時間	60分

---

- [0039] 次に、得られた無電解めっき膜506表面にポリスチレンの溶液(濃度5重量%)を、バーコータを用いて塗布し、乾燥機を用いて70℃で乾燥することによりポリスチレン支持膜507を製膜した。
- [0040] 最後に、ポリスチレン支持膜507によりサポートされた無電解めっき膜506を微細鋳型504から剥離し、リンを副成分として含有しニッケルを主成分とした微小金属構造体を得た。得られた微小金属構造体の成分を蛍光X線測定により分析したところ、副成分であるリンの含有率は4.5 重量%であった。また、得られた微細ニッケル合金構造体の表面を走査型電子顕微鏡により詳細に観察した結果、微細ニッケル合金構造体の表面に存在する微小柱状突起物は欠陥無く形成できていることが確認できた。さらに、収束イオンビーム加工装置を用いて微小柱状突起物を上部から100nm間隔で切削し、その断面を走査型電子顕微鏡により逐次観察し、柱状微小突起物内部にはシームやボイド等の欠陥が存在しないことを確認した。
- [0041] つぎに、分子性無電解めっき触媒の代わりにコロイド状無電解めっき触媒である日立化成工業社製HS202Bを用いた以外は上記方法と同様の方法に従い、微細金属構造体の試作を行った。得られた微細ニッケル合金構造体の表面を走査型電子顕微鏡により詳細に観察した結果、微細ニッケル合金構造体の表面に存在する微小柱状突起物に一部欠損が確認された。さらに、収束イオンビーム加工装置を用いて微小柱状突起物を上部から100nm間隔で切削し、その断面を走査型電子顕微鏡により逐次観察した結果、柱状微小突起物内部に多数のシームやボイド等の欠陥が存在することが明らかとなった。以上より、分子性無電解めっき触媒を適用した場合にのみ欠陥のない微細金属構造体が製造できることが明らかとなった。

## 実施例 2

## [0042] ニッケルホウ素合金構造体

無電解めっき液およびめっき条件を表2に示すものに変えた以外は実施例1と同様の手法により、実施例1で示した微小金属構造体と同様の構造を有するニッケルホウ素合金からなる微小金属構造体を作成した。

## [0043] (表2)

表2 無電解ニッケルめっき液の組成

硫酸ニッケル	$30\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$
ジメチルアミンボラン	$3.4\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$
塩化アンモニウム	$30\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$
コハク酸ナトリウム	$55\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$
ホウ酸	$30\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$
めっき温度	60℃
めっき液pH	6.0
めっき時間	60分

[0044] 得られた微小金属構造体の成分を蛍光X線測定により分析したところ、副成分であるホウ素の含有率は3.0 重量%であった。また、得られた微細ニッケル合金構造体の表面に存在する微小柱状突起物および微小板状突起物は欠陥無く形成できていることが確認できた。さらに、収束イオンビーム加工装置を用いて微小柱状突起物および微小板状突起物を上部から100nm間隔で切削し、その断面を走査型電子顕微鏡により逐次観察し、柱状微小突起物および微小板状突起物内部にはシームやボイド等の欠陥が存在しないことを確認した。

[0045] さらに、実施例1と同様に、分子性無電解めっき触媒の代わりにコロイド状無電解めっき触媒である日立化成工業社製HS202Bを用いた以外は上記方法と同様の方法に従い、微細金属構造体の試作を行った。得られた微細合金構造体の表面を走査

型電子顕微鏡により詳細に観察した結果、微細ニッケル合金構造体の表面に存在する微小柱状突起物に一部欠損が確認された。さらに、収束イオンビーム加工装置を用いて微小柱状突起物を上部から100nm間隔で切削し、その断面を走査型電子顕微鏡により逐次観察した結果、柱状微小突起物内部に多数のシームやボイド等の欠陥が存在することが明らかとなった。以上より、分子性無電解めっき触媒を適用した場合にのみ欠陥のない微細金属構造体が製造できることが明らかとなった。

### 実施例 3

#### [0046] コバルトリン合金構造体

無電解めっき液およびめっき条件を表3に示すものに変えた以外は実施例1と同様の手法により、実施例1で示した微小金属構造体と同様の構造を有するコバルトリン合金からなる微小金属構造体を作成した。

#### [0047] (表3)

表3 無電解コバルトめっき液の組成

硫酸コバルト	$5.0 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$
次亜リン酸ナトリウム	$2.0 \times 10^{-1} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$
コハク酸ナトリウム	$5.0 \times 10^{-1} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$
ホウ酸	$5.0 \times 10^{-1} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$
めっき温度	60℃
めっき液pH	10.0
めっき時間	90分

[0048] 得られた微小金属構造体の成分を蛍光X線測定により分析したところ、副成分であるリンの含有率は5.2重量%であった。また、得られた微細コバルト合金構造体の表面を走査型電子顕微鏡により詳細に観察した結果、微細ニッケル合金構造体の表面に存在する微小柱状突起物および微小板状突起物は欠陥無く形成できていることが確認できた。さらに、収束イオンビーム加工装置を用いて微小柱状突起物および



微小板状突起物を上部から100nm間隔で切削し、その断面を走査型電子顕微鏡により逐次観察し、柱状微小突起物および微小板状突起物内部にはシームやボイド等の欠陥が存在しないことを確認した。

- [0049] さらに、実施例1と同様に、分子性無電解めっき触媒の代わりにコロイド状無電解めっき触媒である日立化成工業社製HS202Bを用いた以外は上記方法と同様の方法に従い、微細金属構造体の試作を行った。得られた微細合金構造体の表面を走査型電子顕微鏡により詳細に観察した結果、微細コバルト合金構造体の表面に存在する微小柱状突起物に一部欠損が確認された。さらに、収束イオンビーム加工装置を用いて微小柱状突起物を上部から100nm間隔で切削し、その断面を走査型電子顕微鏡により逐次観察した結果、柱状微小突起物内部に多数のシームやボイド等の欠陥が存在することが明らかとなった。以上より、分子性無電解めっき触媒を適用した場合にのみ欠陥のない微細金属構造体が製造できることが明らかとなった。

#### 実施例 4

- [0050] パラジウムリン合金構造体

無電解めっき液およびめっき条件を表4に示すものに変えた以外は実施例1と同様の手法により、実施例1で示した微小金属構造体と同様の構造を有するコバルト離リン合金からなる微小金属構造体を作成した。

- [0051] (表4)

表4 無電解パラジウムめっき液の組成

塩化パラジウム	$1.0 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$
次亜リン酸ナトリウム	$6.0 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$
エチレンジアミン	$8.0 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$
チオジグリコール酸	$1.6 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3}$
めっき温度	50℃
めっき液pH	6.5
めっき時間	90分

[0052] 得られた微小金属構造体の成分を蛍光X線測定により分析したところ、副成分であるリンの含有率は4.1重量%であった。また、得られた微細パラジウム合金構造体の表面を走査型電子顕微鏡により詳細に観察した結果、微細ニッケル合金構造体の表面に存在する微小柱状突起物および微小板状突起物は欠陥無く形成できていることが確認できた。さらに、収束イオンビーム加工装置を用いて微小柱状突起物および微小板状突起物を上部から100nm間隔で切削し、その断面を走査型電子顕微鏡により逐次観察し、柱状微小突起物および微小板状突起物内部にはシームやボイド等の欠陥が存在しないことを確認した。

[0053] さらに、実施例1と同様に、分子性無電解めっき触媒の代わりにコロイド状無電解めっき触媒である日立化成工業社製HS202Bを用いた以外は上記方法と同様の方法に従い、微細金属構造体の試作を行った。得られた微細合金構造体の表面を走査型電子顕微鏡により詳細に観察した結果、微細パラジウム合金構造体の表面に存在する微小柱状突起物に一部欠損が確認された。さらに、収束イオンビーム加工装置を用いて微小柱状突起物を上部から100nm間隔で切削し、その断面を走査型電子顕微鏡により逐次観察した結果、柱状微小突起物内部に多数のシームやボイド等の欠陥が存在することが明らかとなった。以上より、分子性無電解めっき触媒を適用した場合にのみ欠陥のない微細金属構造体が製造できることが明らかとなった。

## 実施例 5

[0054] 金被覆微小ニッケルホウ素合金構造体

本実施例では表面が金である微小金属構造体を得る方法を開示する。まず、実施例1および実施例2で開示した方法により、図4に示した微小ニッケルリン合金構造体と同様の構造を有する微小ニッケルホウ素合金構造体と微小ニッケルリン合金構造体を製造した。次に、各々微小ニッケル合金構造体を、上村工業(株)社製の置換金めっき液エリアルTMA液に10分間浸漬することにより、ニッケル合金表面を金に置換し、表面が金である微小ニッケルホウ素合金構造体および微小ニッケルリン合金構造体を得た。この際、めっき液の温度は75℃、pHは7.2とした。

[0055] 得られた構造体はどちらも金光沢を有し、走査型電子顕微鏡により観察したところ、

両者ともに置換金めっき前と後ではその構造に明確な相違は観察されなかった。

## 実施例 6

### [0056] 微細電極

本実施例では金被覆ニッケルリン合金からなるナノピラーを表面に有する微小金属構造体を微量金属イオンの分析手法であるアノードストリッピング法の高感度金電極として適用した例を説明する。

[0057] 本実施例で試作した高感度金電極の作成方法を図6に模式的を示す。まず、実施例5に開示した方法と同等の方法により、微小円柱状突起物を表面に有し、ポリスチレン膜で支持された金被覆ニッケルリン合金薄膜601(縦10ミリメートル, 横10ミリメートル)を得た。ここで、形成した微小円柱状突起物の形状は底部直径180ナノメートル, 上部直径160ナノメートル, 高さ1マイクロメートルであり、柱状微小突起物の中心間のピッチは300ナノメートルであった。次に、金被覆ニッケルリン合金薄膜601を縦15ミリメートル, 横30ミリメートルのガラス基板602に接着し、金被覆ニッケルリン合金薄膜601の周辺部に銅導電テープ603を用いて給電線を作成した。次に、微小円柱状突起物を有する表面の中心部分(5ミリメートル×5ミリメートル)を除き、ガラス基板表面および金被覆ニッケルリン合金薄膜表面をマニキュア膜を塗布することによりシール604を作成し高感度金電極を得た。

[0058] 次に、上記方法で作成した高感度金電極を用いて水溶液中に含まれる微量銅イオンをアノードストリッピング法により分析した。アノードストリッピング法は電極上に溶液中に含まれる金属イオンを還元濃縮し、次に電極をアノード分極して酸化溶出させ、その際の電位や流れる電気量から溶液中のイオンを同定する方法である。まず、銅イオン濃度が $1 \times 10^{-8} \text{ mol/l}$ ,  $1 \times 10^{-9} \text{ mol/l}$ ,  $1 \times 10^{-10} \text{ mol/l}$ ,  $1 \times 10^{-11} \text{ mol/l}$ の4種類の硫酸銅水溶液を超純水を用いて調製した。次に、各々の硫酸銅水溶液について高感度金電極と、比較例として、ガラス基板表面に金を蒸着することにより作成した平滑な金表面を有する基板を電極として用いて、アノードストリッピング法による測定を行った。測定にはガラス製のビーカーを用い、また、対極には白金電極、参照電極には飽和カロメル電極を用いた。ビーカーに硫酸銅水溶液を30cc導入し、電極, 対極および参照電極を浸漬した後、アルゴンガスでパージした。次に、電極に $-0.4$

V vs. SCEの電位を15分間印加し、電極表面に銅を析出させた後に、電極の電位を $-0.1\text{V vs. SCE}$ から $+1.0\text{V vs. SCE}$ まで $0.1\text{V/分}$ で掃引することにより電極表面に析出した銅を溶解し、その際の電位、電流を記録した。得られた結果を表5に示す。微小突起物を有する電極と微小突起物を有さない電極で観察された銅溶解電荷量の比は銅イオン濃度によらず $10\sim 15$ となり、微小突起物を有する電極を有する電極を用いた場合、微小突起物を有さない電極を用いた場合と比較して高精度・高感度に測定を行うことができることが判明した。この原因としては電極表面に微小突起物を形成することにより、電極の表面積が電極表面に微小突起物を有さない場合と比較して飛躍的に増大し、電極表面に析出する銅の量が増大したためであると考えられる。

[0059] (表5)

表5 アノードストリッピング測定結果

銅イオン濃度	微小突起物を有する電極と微小突起物を有さない電極で観察された銅溶解電荷量の比
$1 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$	10.5
$1 \times 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$	11.0
$1 \times 10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$	13.5
$1 \times 10^{-11} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$	14.2

## 実施例 7

[0060] ナノ金型

本実施例では、本発明により作成した微小突起物を有する金属構造体をナノインプリント法のスタンプとして用いた例を説明する。まず、図7に試作したニッケルホウ素合金製のスタンプ701の模式図を示す。スタンプの外寸は6インチ $\phi$ 、厚みは100マイクロメートルであった。スタンプ701は表面に微細な凸凹形状を有するニッケルホウ素合金製構造体702と電気ニッケルめっきにより作成した支持層703からなる。ニッ

ケルホウ素合金製構造体702の表面には、微細柱状突起物704と微細孔705が形成されている。微小突起物704の高さは1マイクロメートル、直径は底部で240ナノメートル、先端部で220ナノメートルであった。また、微小孔705は孔径が表面で240ナノメートル、底部で20ナノメートル、深さ1マイクロメートルであった。また、微細柱状突起物704および微小孔705の中心間距離は360ナノメートルであった。

[0061] スタンパ701は実施例2で詳述したのと同等の方法により作成した。すなわち、6インチシリコン基板をドライエッチングにより加工し、ニッケルホウ素合金製構造体702の表面構造の反転構造を有する鋳型を作成し、その後に、鋳型表面に分子性無電解めっき触媒を付与し、無電解ニッケルホウ素合金めっきを施し表面の凸凹形状を完全に充填した。その後、得られたニッケルホウ素合金めっき膜の裏面に電気ニッケルめっきを施し、厚み90マイクロメートルのニッケル支持層703を形成した。最後に、得られためっき膜を鋳型から剥離し、スタンパ701を得た。

[0062] 次に、図8にスタンパ701を用いて試作したナノプリント装置の模式図を示す。図8(a)はスタンパ701の凸凹部表面に剥離層720を形成するための装置である。図8(b)は基板にスタンパ701の微細凹凸を転写するための装置である。図8(a), (b)それぞれに対してスタンパ701の表面近傍の拡大図を示したものが図9(a) (b)である。

[0063] ここで、プロセス手順を説明する。まず、図9を用いてスタンパ701の表面に、樹脂成形時に、離型を容易にするために剥離剤713をコートする過程を説明する。図9(a)のように表面が平滑なガラス基板714にシリコーン(ポリジメチルシロキサン)系剥離剤713をスピスコートし200ナノメートル厚みに塗布した。この剥離剤付き基板を図8(a)ステージ708上に置き、真空チャックで固定した。さらにこの上にスタンパ701と緩衝材712(5インチφ厚さ3mm)とを配した。加圧機構710を用いて2MPaの圧力でプレスすることにより、スタンパ表面701に剥離剤層720を形成した。緩衝材712は基板714のうねりにスタンパを沿わせるために用いたものである。スタンパ701のパターン深さより剥離剤713の厚みを薄くしておくことによってスタンパ701の凸凹部表面にのみ剥離層720を形成することができる。次に、圧力を解放し、ステージを上昇させることにより表面が剥離剤でコートされたスタンパ701を得た。

[0064] 次に、剥離剤をコートしたスタンパ701を用いて、樹脂を成形するプロセスを説明す

る。まず、Si基板721(6インチφ厚さ0.5mm)に樹脂722(ポリスチレン679, エイアンドエム製)を厚さ600nmになるようにスピコートした。剥離剤でコートされたスタンプ701を位置決めして組み合わせた後、図8(b)のステージ718上にセットした。図8(b)の微細構造転写装置は図8(a)の剥離材形成装置と異なり、真空チャンバ717を有し、ステージ718は加熱機構を備えている。これを、0.1Torr以下に減圧し、250℃に加熱した上で、12MPaで10分間保持して加圧した。次に、100℃以下になるまで放冷後、大気解放を行った。室温にてスタンプ裏面に剥離治具を接着固定し、0.1mm/sで鉛直方向に引き上げたところ、樹脂表面にスタンプ表面の形状が転写された。

- [0065] 次に、同一の剥離剤でコートされたスタンプ701を用いて上記樹脂成形プロセスを100回繰り返して、スタンプ表面の形状が転写された成形体を100個得た。次に、上記プロセスを100回実施した後のスタンプ表面をSEMにより詳細に観察したところ、表面の微細構造体には損傷が認められず、本発明により作成した微小金属構造体はナノ金型として十分な強度を有することが判明した。

## 実施例 8

- [0066] フッ素分子固定ナノ金型

本実施例では、微細金属構造体の表面を金により被覆し、その表面にフッ素を含有する分子を共有結合することにより、ナノインプリント処理時に剥離剤でコートすること無く、成形した樹脂が容易に剥離するスタンプを作成した例を示す。

- [0067] まず、実施例7と同様な方法により図7で示したものと同一構造を有するニッケルホウ素合金製のスタンプを作成した。次に、実施例5に示した方法によりスタンプ表面に金の置換めつきを施し、金の被覆層を形成した。次に、金で被覆したスタンプを、化合物1に化学構造式を示した1H, 1H, 2H, 2H-パーフロオロデカンチオール(英国アポロサイエンス社製)のエタノール溶液(濃度 $1.0 \times 10^{-4}$  mol/l)に室温において1時間浸漬することにより、スタンプ表面の金原子と1H, 1H, 2H, 2H-パーフロオロデカンチオールのイオウ原子を化学的に結合し、スタンプ表面に化合物1が密に固定化された層を有するスタンプを得た。なお、本実施例用いるフッ素を含有する分子はフルオロカーボン鎖にチオール基が結合した化合物であればよく、化合物1に特に限定されるものではない。

[0068] (化合物1)  $\text{CF}_3\text{-(CF}_2\text{)}_7\text{-(CH}_2\text{)}_2\text{-SH}$

[0069] 次に、表面に化合物1層を形成したスタンプを用いて、スタンプ表面に剥離層を形成するプロセスを省略した以外は実施例7で示したプロセスに従い、ポリスチレン樹脂のナノインプリント処理を100回繰り返して実施した。その結果、すべてのナノインプリント処理において樹脂表面からスタンプは容易に剥離し、樹脂表面にスタンプ表面の形状が正確に転写された。また、ナノインプリント処理を100回繰り返した後に、スタンプをSEMにより詳細に観察したところ、表面に微細構造体には損傷が認められず、本発明により作成した微小金属構造体は十分な樹脂剥離性能と強度を有することが判明した。

## 実施例 9

[0070] DNA固定Niナノピラー

本実施例では、金により被覆された微細金属構造体表面にDNAプローブを固定化し、高感度DNAチップとして適用した例を示す。

[0071] DNAチップの原理は以下の通りである。先ず、解析対象のDNAターゲットを標識化する。基板上に固定化されたDNAプローブに、標識化したDNAターゲットをハイブリダイズさせる。DNAターゲットは、固定化された複数のDNAプローブのうち、当該DNAターゲットと相補的な塩基配列を持つDNAプローブと特異的にハイブリダイズする。この後、DNAプローブにハイブリダイズしているDNAターゲットから発せられるシグナルを測定する。シグナルを測定することによって、DNAターゲットがハイブリダイズしているDNAプローブを同定するとともに、ハイブリダイズしているDNAターゲット量を測定することができる。例えば、蛍光標識されたDNAターゲットを用いる場合は、ハイブリダイズしている領域の蛍光シグナル値からハイブリダイズしていない領域のシグナル値であるバックグラウンドを差し引いた値が検出量となるため、ハイブリダイズしている領域の蛍光シグナル値を高め、且つ、バックグラウンド値を低くすることで検出感度を高めることができる。バックグラウンド値に対する蛍光シグナル値を向上する方法として、DNAプローブを固定化する基板の表面積を増大することが効果的である。そこで本実施例では、平板と比較して、飛躍的に表面積を増大させた基板として表面が金で被覆された微小ニッケルホウ素合金構造体を適用した例を示す。

[0072] 本実施例で試作したDNA固定化基板を図10に模式的を示す。まず、実施例5に開示した方法と同等に方法により、微小円柱状突起物を表面に有し、ポリスチレン支持膜1003で支持され金属1001で被覆されたニッケルリン合金薄膜1002(縦20ミリメートル、横40ミリメートル)を得た(図10(a))。ここで、形成した微小円柱状突起物の形状は底部直径180ナノメートル、上部直径160ナノメートル、高さ1.5 マイクロメートルであり、柱状微小突起物の中心間のピッチは300ナノメートルであった。次に、ポリスチレン支持膜1003をスライドガラス基板1004に接着し、微小円柱上突起物を表面に有するDNA固定化用基板とした。

[0073] 次に、自動DNA合成機(Applied Biosystem社製, model 394 DNA synthesizer)を用いて配列番号1に示す、チオール基が導入されたDNAプローブ1005を合成した。

[0074] (配列番号1)

HS-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-O-PO<sub>3</sub><sup>-</sup>-O-5' -cccttttgtccccaacttgagatgtatgaaggctttt  
gggtctccctgggagtggtggagggcagccagggcttacctgtacactgacttgagaccagttgaataaaagtgcac  
acctta-3'

得られたDNAプローブ1005は高速液体クロマトグラフィで精製した。次に、濃度2 μMのDNAプローブ1005を1 μlとHEPES緩衝溶液(N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N, -2-エタンスルホン酸; 10mM, pH6.5) 4 μlと添加剤(エチレングリコール) 5 μlとを混合してスポッティング溶液を調製した。このスポッティング溶液をスポッタ(日立ソフト社製 SPBIO 2000)を用いてDNA固定化用基板表面の金属1001の任意の点にスポッティングした後、室温で2時間放置して、金属1001とDNAプローブ1005のチオール基を結合し、微小円柱上突起物を表面に有するDNA固定化用基板にDNAプローブ1005を固定化した(図10(b))。DNAのスポッティングはスポッティング溶液を先端に付与した金属製の針を基板表面に押し当てて行う。そのため、一般に高アスペクトの微小円柱を表面に有する基板をDNA固定化用基板として用いた場合、スポッティング過程において微小円柱が破損する懸念がある。しかしながら、本発明を適用して製造した微小円柱を表面に有する基板を用いた場合、十分な強度の微小円柱状を得ることができ、スポッティング後に微小円柱に破損は認めら



れなかった。

[0075] DNA自動合成機を用いてDNAプローブ1005相補的な塩基配列を持ち、5'末端がテキサスレッドで蛍光標識されたDNAターゲットを合成した。次に、濃度0.1  $\mu$ MのDNAターゲット8  $\mu$ lと20×SSC(和光純薬社製) 1.7  $\mu$ lと10%ドデシル硫酸ナトリウム水溶液(ライフテック オリエンタル社製) 0.3  $\mu$ lとを混合してハイブリダイゼーション溶液を調整した。その後、DNAプローブ1005を固定化した微小円柱上突起物を表面に有するDNA固定化用基板に、ハイブリダイゼーション溶液を滴下し、カバーガラスを乗せた後、40℃の恒温槽内に12時間放置してハイブリダイゼーション反応を行った。ハイブリダイゼーション反応後、20×SSCの10倍希釈液と10%ドデシル硫酸ナトリウム水溶液の300倍希釈液との混合液中にスライドガラスを浸してカバーガラスをはずした後、20×SSCの100倍希釈液でスライドガラスを洗浄した。最後に、マイクロタイタープレート用遠心機を用いて基板上の水分を除いた後、マイクロアレイ用スキャナー(GSI Lumonics社製 Scan Array 5000)を用いてDNAプローブ1005が固定化された領域の蛍光強度(ハイブリダイゼーションシグナル)とDNAプローブ1005が固定化されていない領域の蛍光強度(バックグラウンドシグナル)を測定した。

[0076] 次に、微小円柱上突起物を表面に有するDNA固定化用基板に変えて、表面が平滑な金薄膜を有するスライドガラス基板を用いた以外は上記方法と同様の方法で実験を行いDNAプローブ1005が固定化された領域の蛍光強度(ハイブリダイゼーションシグナル)とDNAプローブ1005が固定化されていない領域の蛍光強度(バックグラウンドシグナル)を測定した。ここで表面が平滑な金薄膜を有するスライドガラス基板は、スライドガラスに金を100ナノメートル蒸着することにより作成した。

[0077] 表6に微小円柱上突起物を表面に有するDNA固定化用基板と平滑な金表面を有するスライドガラス基板を用いて、ハイブリダイゼーションを行い、それぞれDNAプローブ1005が固定化されていない領域の蛍光強度に対するDNAプローブ1005が固定化されている領域の蛍光強度の比を測定した結果を示す。

[0078] (表6)

表6 DNAプローブが固定化されていない領域の蛍光強度に対するDNAプロ

ープが固定化されている領域の蛍光光強度の比

基板	蛍光強度比
平滑な金表面を有するスライドガラス基板	80
微小円柱上突起物を表面に有するDNA固定化用基板	780

- [0079] 表6の結果より、本発明により得られる微細金属構造体をDNA固定化用基板として適用すると、高感度にDNAを検出できることが判明した。

### 実施例 10

#### [0080] DNAチップ

実施例9に示した方法を用いて、スライドガラス1枚あたりに200種類の一本鎖DNAプローブがアレイ状に固定化されたDNAチップを作成した。なお、DNAプローブとして実施例9に示した方法で合成した末端がチオール基で修飾された25塩基長の一本鎖DNAプローブを用いた。また、200種類のDNAプローブが持つそれぞれの塩基配列として、表7～14に示した200種類の各遺伝子断片がそれぞれ持つ固有の連続した25塩基配列を用いた。

- [0081] 次に、以下の方法でハイブリダイゼーション溶液を作成した。ディッシュ内に約 $2 \times 10^6$ 個のすい臓ガン細胞 (American Type Culture Collection社製, CFPAC1) と10mlの培地を加え、二日に一度培地を交換しながら37℃で一週間細胞を培養した。なお、培地としてD-MEM (ライフテック オリエンタル社製) とFetal Bovine Serum, Qualified (ライフテック オリエンタル社製) の9:1混合液を用いた。培養後、ディッシュから培地を取り除き、さらにGTC溶液 (グアニジンチオシアネート; 4M, トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン; 0.1M, 2-メルカプトエタノール; 1%, pH7.5) を加え培養細胞を溶解した。次に、N-ラウロイルサルコシン酸ナトリウムを最終濃度が0.5% になるように加えた後、5000r.p.m. で10分間遠心してから上清液を取り出した。得られた上清液に5.7M の塩化セシウム溶液を上清液と塩化セシウム溶液の比が7:3になるように加えた後、さらに適量の軽質流動パラフィンを加え35000r.p.m. で12

時間遠心した。遠心後、下層に沈殿しているRNAペレットを取り出した。得られたRNAペレットを適量のTES溶液(トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン;10mM, エチレンジアミン四酢酸;5mM, ドデシル硫酸ナトリウム;1%, pH7.4)に溶解した後、エタノール沈殿を行ってRNAペレットを濃縮・精製した。次に、精製されたRNAペレットをDEPC溶液(二酸化ジエチル;0.1%)に溶解した後、m-RNA精製キット(Invitrogen社製、Micro-Fast Track2.0 Kit)を用いてRNAペレットからmRNAを取り出した。得られたmRNAを1ug/ulに希釈した後、希釈液1ulに0.5ug/ulのOligo dTプライマ(ライフテック オリエンタル社製)1ulとDEPC溶液5ulを加え70℃で5分間保温した。次に、得られた溶液5μlにSuper Script II バッファー(ライフテック オリエンタル社製, Super Script II Reverse Transcriptase)5μl, dNTP mixture (2mM dUTP, 5mM dATP, 5mM dGTP, 5mM dCTP)2ul, 100mM DTT(Dithiothreitol)2μl, 40U Rnasin(TOYOBO社製 Rnase Inhibitor)2.5ul, 1mM FluoriLink dUTP(アマシャムファルマシア社製, Fluoro Link Cy5-dUTP)2ul、及びSSII(ライフテック オリエンタル社製, Super Script II Reverse Transcriptase)1ulを混合した後、42℃で30分間保温した。その後、さらにSSII(ライフテック オリエンタル社製, Super Script II Reverse Transcriptase)を1ul加え再び42℃で30分保温した。保温後の溶液にDEPC溶液20ul, 0.5M エチレンジアミン四酢酸5ul、及び1Nの水酸化ナトリウム水溶液10ulを加え65℃で60分保温した後、1Mのトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン緩衝溶液(pH7.5)を25ul加え中和した。その後、中和したサンプル溶液をMicrocon-30(Amicon社製)に入れ8000r.p.m.で4分間遠心した後10〜20ulに濃縮して未反応のdNTPを除去した。得られた溶液、20×Denhardt's solution(SIGMA社製), 20×SSC、及びドデシル硫酸ナトリウムを適量混合し、最終濃度が100pg/μl DNAターゲット, 2×Denhardt's solution, 4×SSC, 0.2%ドデシル硫酸ナトリウムとなるようなハイブリダイゼーション溶液24.5μlを作成した。

[0082] 次に、前述の方法で得られたDNAチップとハイブリダイゼーション溶液を用いて以下のようなハイブリダイゼーション反応を行った。

[0083] ハイブリダイゼーション溶液を95℃で一分間熱変性した後、スライドガラス上にハイブリダイゼーション溶液を滴下しカバーガラスを乗せた。その後、スライドガラスを40

℃の恒温槽内に12時間放置してハイブリダイゼーション反応を行った。ハイブリダイゼーション反応後、 $20\times$  SSCの10倍希釈液と10%ドデシル硫酸ナトリウム水溶液の300倍希釈液との混合液中にスライドガラスを浸漬してカバーガラスをはずした後、 $20\times$  SSCの100倍希釈液でスライドガラスを洗浄した。次に、マイクロタイタープレート用遠心機を用いてスライドガラス上の水分を除いた後、マイクロアレイ用スキャナー(GSI Lumonics社製 Scan Array 5000)を用いて200点のスポットの蛍光強度(ハイブリダイゼーションシグナル)とDNAプローブが固定化されていない領域の蛍光強度(バックグラウンドシグナル)を測定した。各スポットについて、得られたハイブリダイゼーションシグナルからバックグラウンドシグナルを差し引いて200点の発現量を求めた。上記ハイブリダイゼーション反応を合計2回行い、各点についてそれぞれ1回目の発現量を横軸に、また2回目の発現量を縦軸取って、図11に示すようなスキャッチャードプロットを得た。

[0084] 次に、微小円柱上突起物を表面に有するDNA固定化用基板に変えて、表面が平滑な金薄膜を有するスライドガラス基板を用いた以外は上記方法と同様の方法でDNAチップを作成し、ハイブリダイゼーションを行い、図12に示すスキャッチャードプロットを得た。

[0085] 微小円柱上突起物を表面に有するDNA固定化用基板を用いたDNAチップは表面積が大きくDNAターゲットの検出感度が向上しており、図11と図12を比較すれば明らかなように、微小円柱上突起物を表面に有するDNA固定化用基板を用いると、平滑な表面を有する基板を用いた場合と比較して、蛍光強度のダイナミックレンジが拡大し、かつ測定の再現性のばらつきを抑制することができた。

[0086] [表7]

表7 核酸プローブに用いた遺伝子名 (1)

GenBank	遺伝子名
A03911	H.sapiens mRNA for glia-derived neurite-promoting factor (GdNPF)
A26792	H.sapiens CNTF coding sequece (form b+c)(comp.)
AB003791	Homo sapiens mRNA for keratan sulfate Gal-6-sulfotransferase
AB012192	Homo sapiens mRNA for chondroitin 6-sulfotransferase
AF000546	Homo sapiens purinergic receptor P2Y5 mRNA
AF000974	Human zyxin related protein ZRP-1 mRNA
AF001954	Homo sapiens growth inhibitor p33ING1 (ING1) mRNA
AF004430	Homo sapiens hD54+ins2 isoform (hD54) mRNA
AF007111	Homo sapiens MDM2-like p53-binding protein (MDMX) mRNA
AF009674	Homo sapiens axin (AXIN) mRNA
AF010127	Homo sapiens Casper mRNA
AF010310	Homo sapiens p53 induced protein mRNA partial cds
AF013168	Homo sapiens hamartin (TSC1) mRNA
AF015950	Homo sapiens telomerase reverse transcriptase (hTERT) mRNA
AF016267	Homo sapiens TRAIL receptor 3 mRNA
AF016268	Homo sapiens death receptor 5 (DR5) mRNA
AF016582	Homo sapiens checkpoint kinase Chk1 (CHK1) mRNA
AF018253	Homo sapiens receptor activator of nuclear factor-kappa B (RANK) mRNA
AF019770	Homo sapiens macrophage inhibitory cytokine-1 (MIC-1) mRNA
AF019952	Homo sapiens tumor suppressing STF cDNA 1 (TSSC1) mRNA
AF022109	Homo sapiens HsCdc18p (HsCdc18) mRNA
AF022224	Homo sapiens Bcl-2-binding protein (BAG-1) mRNA
AF026816	Homo sapiens putative oncogene protein mRNA partial cds
AF029403	Homo sapiens oxysterol 7alpha-hydroxylase (CYP7b1) mRNA
AF037195	Homo sapiens regulator of G protein signaling RGS14 mRNA
AF038009	Homo sapiens tyrosylprotein sulfotransferase-1 mRNA
AF040705	Homo sapiens putative tumor suppressor protein unspliced form (Fus-2) mRNA
AF040707	Homo sapiens candidate tumor suppressor gene 21 protein isoform I mRNA

[0087] [表8]

表8 核酸プローブに用いた遺伝子 (2)

GenBank	遺伝子名
AF043254	Homo sapiens heat shock protein 75 (hsp75) mRNA
AF049891	Homo sapiens tyrosylprotein sulfotransferase-2 mRNA
AF053712	Homo sapiens osteoprotegerin ligand mRNA
AF055584	Homo sapiens SULT1C sulfotransferase (SULT1C) mRNA
AF059195	Homo sapiens basic-leucine zipper transcription factor MafG (MAFG) mRNA
AF061836	Homo sapiens putative tumor suppressor protein (RDA32) mRNA
AF067512	Homo sapiens PITSLRE protein kinase alpha SV1 isoform (CDC2L1) mRNA
AF067519	Homo sapiens PITSLRE protein kinase beta SV1 isoform (CDC2L2) mRNA
AF070594	Homo sapiens clone 24570 HNK-1 sulfotransferase mRNA
AF087017	Homo sapiens H19 gene complete sequence
AF090318	Homo sapiens sterol 12-alpha hydroxylase CYP8B1 (Cyp8b1) mRNA
AF112219	Homo sapiens esterase D mRNA
AF188698	Homo sapiens sulfotransferase-like protein mRNA
AF237982	Homo sapiens oxysterol 7alpha-hydroxylase (CYP39A1) mRNA
AI445492	NCI_CGAP_Gas4 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:2142448 3' mRNA sequence
AJ004832	Homo sapiens mRNA for neuropathy target esterase
AL021878	Human CYP2D7AP
AL021878	Human CYP2D8P
D14012	Human mRNA for hepatocyte growth factor (HGF) activator precursor
D14497	Human mRNA for proto-oncogene protein
D14838	Human mRNA for FGF-9
D14889	Human mRNA for small GTP-binding protein S10
D16234	Human mRNA for phospholipase C-alpha
D26512	Human mRNA for membrane type matrix metalloproteinase
D37965	Human mRNA for PDGF receptor beta-like tumor suppressor (PRLTS)

[0088] [表9]

表9 核酸プローブに用いた遺伝子 (3)

GenBank	遺伝子名
D38122	Human mRNA for Fas ligand
D38305	Human mRNA for Tob
D43968	Human AML1 mRNA for AML1b protein (alternatively spliced product)
D49742	Human mRNA for HGF activator like protein
D50310	Human mRNA for cyclin I
D86640	Homo sapiens mRNA for stac, complete cds
D88667	Homo sapiens mRNA for cerebroside sulfotransferase
D89479	Homo sapiens mRNA for ST1B2
D89667	Homo sapiens mRNA for c-myc binding protein
D90224	Human mRNA for glycoprotein 34 (gp34)
J02625	Human cytochrome P-450j mRNA
J02871	Human lung cytochrome P450 (IV subfamily) BI protein
J02906	Human cytochrome P450IIF1 protein (CYP2F) mRNA
J02958	Human MET proto-oncogene mRNA
J03210	Human collagenase type IV mRNA 3' end
J03241	Human transforming growth factor-beta 3 (TGF-beta3) mRNA
J03518	Human epoxide hydrolase , microsomal (xenobiotic) (EPHX1) mRNA
J03528	Human cation-independent mannose 6-phosphate receptor mRNA
J03817	Human glutathione transferase M1B (GST1) mRNA
J03934	Human, NAD(P)H:menadione oxidoreductase mRNA
J04093	Homo sapiens phenol UDP-glucuronosyltransferase (UDPGT) mRNA
J04127	Human aromatase system cytochrome P-450 (P450XIX) mRNA
J05070	Human type IV collagenase mRNA
J05459	Human glutathione transferase M3 (GSTM3) mRNA
K01171	Human HLA-DR alpha-chain mRNA
K02276	Human (Daudi) translocated t(8;14) c-myc oncogene mRNA
K03191	Human cytochrome P-1-450 (TCDD-inducible) mRNA
K03222	Human (cell line 1027 F57) transforming growth factor-alpha mRNA
L03840	Human fibroblast growth factor receptor 4 (FGFR4) mRNA

[0089] [表10]

表10 核酸プローブに用いた遺伝子 (4)

GenBank	遺伝子名
L04288	Homo sapiens cyclophilin-related protein mRNA
L04751	Human cytochrome p-450 4A (CYP4A) mRNA
L05779	Human cytosolic epoxide hydrolase mRNA
L06895	Homo sapiens antagonist of myc transcriptional activity (Mad) mRNA
L07594	Human transforming growth factor-beta type III receptor (TGF-beta) mRNA
L07765	Human carboxylesterase mRNA
L07868	Homo sapiens receptor tyrosine kinase (ERBB4) gene
L09753	Homo sapiens CD30 ligand mRNA
L11353	Human moesin-ezrin-radixin-like protein mRNA
L12260	Human recombinant glial growth factor 2 mRNA and flanking regions
L12964	Human activation dependent T cell mRNA
L13286	Human mitochondrial 125-dihydroxyvitamin D3 24-hydroxylase mRNA
L13972	Homo sapiens beta-galactoside alpha-23-sialyltransferase (SIAT4A) mRNA
L15409	Homo sapiens von Hippel-Lindau disease tumor suppressor mRNA sequence
L17075	Human TGF-b superfamily receptor type I mRNA
L19063	Human glial-derived neurotrophic factor gene
L19067	Human NF-kappa-B transcription factor p65 subunit mRNA
L20320	Human protein serine/threonine kinase stk1 mRNA
L22005	Human ubiquitin conjugating enzyme mRNA
L22474	Human Bax beta mRNA
L25610	Homo sapiens cyclin-dependent kinase inhibitor mRNA
L25676	Homo sapiens CDC2-related kinase (PITALRE) mRNA
L25851	Homo sapiens integrin alpha E precursor mRNA
L27211	Human CDK4-inhibitor (p16-INK4) mRNA
L29216	Homo sapiens clk2 mRNA

[0090] [表11]



表11 核酸プローブに用いた遺伝子 (5)

GenBank	遺伝子名
L29220	Homo sapiens clk3 mRNA
L29222	Homo sapiens clk1 mRNA
L29277	Homo sapiens DNA-binding protein (APRF) mRNA
L32179	Human arylacetamide deacetylase mRNA
L33264	Homo sapiens CDC2-related protein kinase (PISSLRE) mRNA
L35253	Human p38 mitogen activated protein (MAP) kinase mRNA
L40027	Homo sapiens glycogen synthase kinase 3 mRNA
L78440	Homo sapiens STAT4 mRNA
M10988	Human tumor necrosis factor (TNF) mRNA
M11730	Human tyrosine kinase-type receptor (HER2) mRNA
M12272	Homo sapiens alcohol dehydrogenase class I gamma subunit (ADH3) mRNA
M12783	Human c-sis/platelet-derived growth factor 2 (SIS/PDGF2) mRNA
M12963	Human class I alcohol dehydrogenase (ADH1) alpha subunit mRNA
M13194	Human excision repair protein (ERCC1) mRNA clone pcDE
M13228	Human N-myc oncogene protein mRNA
M13755	Human interferon-induced 17-kDa/15-kDa protein mRNA
M14505	Human (clone PSK-J3) cyclin-dependent protein kinase mRNA .
M14564	Human cytochrome P450c17 (steroid 17-alpha-hydroxylase/1720 lyase) mRNA
M14695	Human p53 cellular tumor antigen mRNA
M14745	Human bcl-2 mRNA
M14764	Human nerve growth factor receptor mRNA
M15024	Human c-myb mRNA
M15400	Human retinoblastoma susceptibility mRNA
M16038	Human lyn mRNA encoding a tyrosine kinase
M17016	Human serine protease-like protein mRNA
M17252	Human cytochrome P450c21 mRNA 3' end
M18112	Human poly(ADP-ribose) polymerase mRNA

[0091] [表12]

表12 核酸プローブに用いた遺伝子 (6)

GenBank	遺伝子名
M18737	Human Hanukah factor serine protease (HuHF) mRNA (cytotoxic T-lymphocyte-associated serine esterase 3)
M19154	Human transforming growth factor-beta-2 mRNA
M19720	Human L-myc protein gene
M19722	Human fgr proto-oncogene encoded p55-c-fgr protein
M20403	Human cytochrome P450 db1 mRNA
M21574	Human platelet-derived growth factor receptor alpha (PDGFRA) mRNA
M21616	Human platelet-derived growth factor (PDGF) receptor mRNA
M21758	Human glutathione S-transferase A2 (GSTA2) mRNA
M22995	Human ras-related protein (Krev-1) mRNA
M23619	Human HMG-I protein isoform mRNA (HMGI gene) clone 6A
M24898	Human triiodothyronine receptor (THRA1 ear1) mRNA
M25753	Human cyclin B mRNA 3' end
M26880	Human ubiquitin mRNA
M27968	Human basic fibroblast growth factor (FGF) mRNA
M28209	Homo sapiens GTP-binding protein (RAB1) mRNA
M28211	Homo sapiens GTP-binding protein (RAB4) mRNA
M28215	Homo sapiens GTP-binding protein (RAB5) mRNA
M29366	Human epidermal growth factor receptor (ERBB3) mRNA
M29870	Human ras-related C3 botulinum toxin substrate (rac) mRNA variant 1
M30496	Human ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase (PGP 9.5, UCH-L3) isozyme L3 mRNA
M30817	Human interferon-induced cellular resistance mediator protein (MxA)mRNA
M30818	Human interferon-induced cellular resistance mediator protein (MxB) mRNA
M31165	Human tumor necrosis factor-inducible (TSG-6) mRNA fragment adhesion receptor CD44 putative CDS
M31899	Human DNA repair helicase (ERCC3) mRNA

[0092] [表13]

表13 核酸プローブに用いた遺伝子 (7)

GenBank	遺伝子名
M32977	Human heparin-binding vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA
M33318	Human cytochrome P450IIA3 (CYP2A3) mRNA
M34065	Human cdc25Hs mRNA
M34309	Human epidermal growth factor receptor (HER3) mRNA
M34641	Human fibroblast growth factor (FGF) receptor-1 mRNA
M35296	Human tyrosine kinase arg gene mRNA
M35410	Human insulin-like growth factor binding protein 2 (IGFBP2) mRNA
M35416	Human GTP-binding protein (RALB) mRNA
M35543	Human GTP-binding protein (G25K) mRNA
M36542	Human lymphoid-specific transcription factor mRNA
M36981	Human putative NDP kinase (nm23-H2S) mRNA
M37825	Human fibroblast growth factor-5 (FGF-5) mRNA
M54915	Human h-pim-1 protein (h-pim-1) mRNA
M54968	Human K-ras oncogene protein mRNA
M55618	Homo sapiens hexabrachion (HXB) mRNA
M57230	Human membrane glycoprotein gp130 mRNA
M57732	Human hepatic nuclear factor 1 (TCF1) mRNA
M58051	Human fibroblast growth factor receptor (FGFR3) mRNA
M58525	Homo sapiens catechol-O-methyltransferase (COMT) mRNA
M59040	Human cell adhesion molecule (CD44) mRNA
M59465	Human tumor necrosis factor alpha inducible protein A20 mRNA
M59964	Human stem cell factor mRNA
M60278	Human heparin-binding EGF-like growth factor mRNA
M60614	Human Wilms' tumor (WIT-1) associated protein mRNA
M60618	Human nuclear autoantigen (SP-100) mRNA
M60718	Human hepatocyte growth factor mRNA
M60828	Human keratinocyte growth factor mRNA
M60854	Human ribosomal protein S16 mRNA
M60915	Human neurofibromatosis protein type I (NF1) mRNA

[0093] [表14]

表14 核酸プローブに用いた遺伝子 (8)

GenBank	遺伝子名
M60974	Human growth arrest and DNA-damage-inducible protein (gadd45) mRNA
M61176	Homo sapiens brain-derived neurotrophic factor precursor (BDNF) mRNA
M61853	Human cytochrome P450C18 (CYP2C18) mRNA clone 6b
M61854	Human cytochrome P450C19 (CYP2C19) mRNA clone 11a
M61857	Human cytochrome P450C9 (CYP2C9) mRNA clone 65
M62401	Human sterol 27-hydroxylase (CYP27) mRNA
M62829	Human transcription factor ETR103 mRNA
M63167	Human rac protein kinase alpha mRNA
M64240	Human helix-loop-helix zipper protein (max) mRNA
M64349	Human cyclin D (cyclin D1) mRNA
M68520	Human cdc2-related protein kinase mRNA
M73791	Human novel gene mRNA
M73812	Human cyclin E mRNA sequence

## 産業上の利用可能性

[0094] 本発明によると、表面に、高強度で精度が高くアスペクト比の大きな微小突起物を有する、微細金属構造体および前記微細構造体を欠陥無く製造する方法を提供できる。また、上記微細構造体を用い高精度で高信頼性の装置あるいはデバイス、特に樹脂や無機物を加圧成形するナノインプリントに用いる微細金型およびナノインプリント装置、電気化学反応により物質を変換、製造あるいは検出するための電極、およびDNAチップ等を提供することが可能となる。

上記記載は実施例についてなされたが、本発明はそれに限らず、本発明の精神と添付の請求の範囲の範囲内で種々の変更および修正をすることができることは当業者に明らかである。

## 図面の簡単な説明

- [0095] [図1]表面に微小突起物を有する微細金属構造体の形状を例示した模式図。  
 [図2]表面に微小突起物を有する微細金属構造体を製造するための工程図。  
 [図3]触媒を基点としためっき成長過程を示す模式図。

[図4]微小金属構造体表面の走査型電子顕微鏡写真を基にした模式図。

[図5]微小金属構造体の製造工程図。

[図6]高感度金電極の製造工程図。

[図7]スタンプの模式図。

[図8]図8(a)はスタンプの凸部表面に剥離材を形成するための装置、図8(b)は基板にスタンプの微細凹凸を転写するための装置。

[図9]図9(a)(b)は、図8(a),(b)それぞれに対するスタンプの表面近傍の拡大図。

[図10]図10(a)DNA固定化基板の模式図、図10(b)はDNA固定化基板表面にDNAプローブが固定化された状態を示す模式図。

[図11]表面に微小突起物を有するDNA固定化基板を用いて、ハイブリダイゼーション実験を行った結果を示したスキッチャードプロット。

[図12]平滑な表面を有するDNA固定化基板を用いて、ハイブリダイゼーション実験を行った結果を示したスキッチャードプロット。

## 請求の範囲

- [1] 表面に微小突起物を有する微細金属構造体であって、厚みあるいは相当直径が10ナノメートルから10マイクロメートルであり、高さ(H)に対する、相当直径(D)の比( $H/D$ )が1より大きい微小突起物を有していることを特徴とする微細金属構造体。
- [2] 前記微小突起物が、非金属元素を副成分として含有する合金であることを特徴とする請求項1に記載の微細金属構造体。
- [3] 前記非金属元素がホウ素であることを特徴とする請求項2に記載の微細金属構造体。
- [4] 前記微小突起物の表面の少なくとも一部分が、少なくとも一層の被覆層により被覆されていることを特徴とする請求項2に記載の微細金属構造体。
- [5] 前記微小突起物の表面に直接あるいは間接的に抗原、抗体、タンパク、塩基、糖鎖及び表面改質剤のうち少なくとも一種類の有機物が固定化されていることを特徴とする請求項2に記載の微細金属構造体。
- [6] 表面に微小突起物を有する微細金属構造体であって、微細な凹凸パターンを有する基板の表面に分子性無電解触媒を付与し、無電解めっきにより形成された金属層を該基板から剥離し該凹凸パターンを反転転写することにより得られたことを特徴とする微細金属構造体。
- [7] 厚みあるいは相当直径が10ナノメートルから10マイクロメートルである微小突起物を有することを特徴とする請求項6に記載の微細金属構造体。
- [8] 前記微小突起物の高さ(H)に対する、前記微小突起物の相当直径(D)の比( $H/D$ )が1より大きいことを特徴とする請求項7に記載の微細金属構造体。
- [9] 前記微小突起物が、非金属元素を副成分として含有する合金であることを特徴とする請求項7に記載の微細金属構造体。
- [10] 前記微小突起物の表面の少なくとも一部分が、少なくとも一層の被覆層により被覆されていることを特徴とする請求項7に記載の微細金属構造体。
- [11] 前記微小突起物の表面に直接あるいは間接的に抗原、抗体、タンパク、塩基、糖鎖及び表面改質剤のうち少なくとも一種類の有機物が固定化されていることを特徴とする請求項7に記載の微細金属構造体。

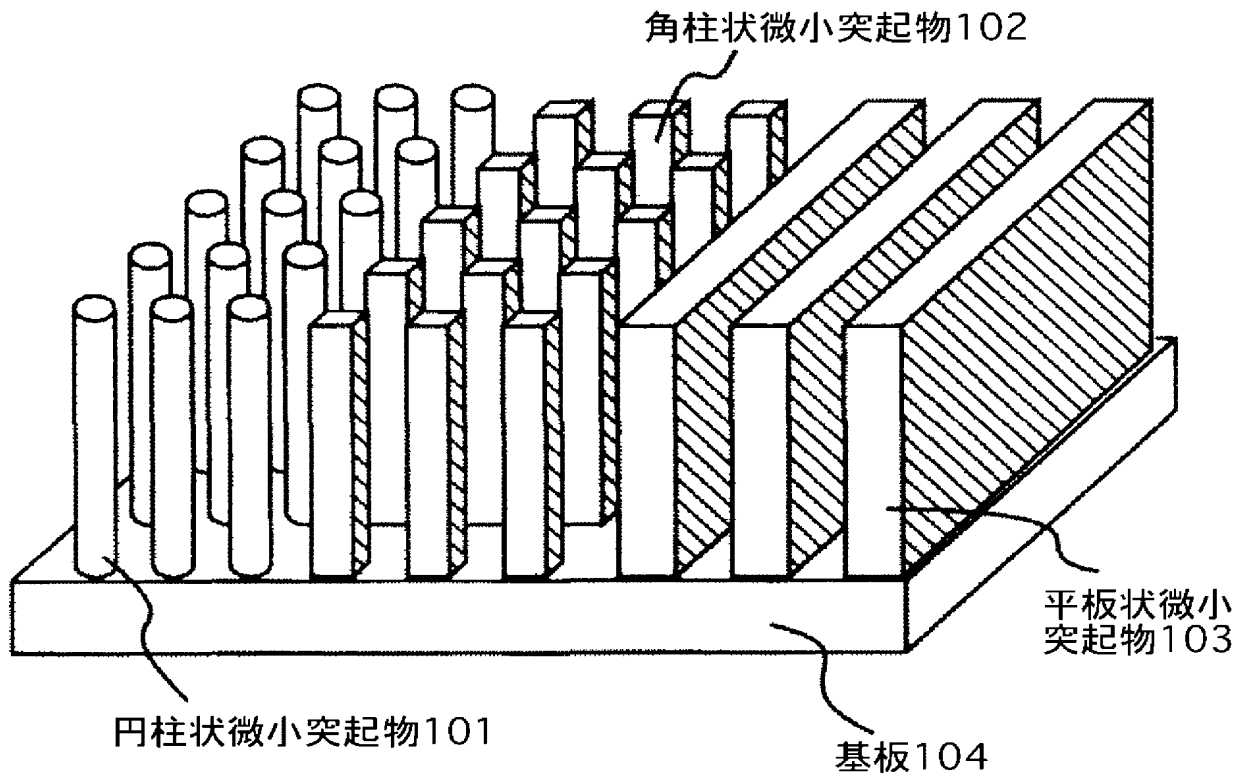
- [12] 表面に微小突起物を有する微細金属構造体にあつて、前記微小突起物の表面の少なくとも一部分が、前記微小突起物を構成している成分と異なる成分からなる、少なくとも一層の被覆層により被覆されていることを特徴とする微細金属構造体。
- [13] 前記微小突起物の厚みあるいは相当直径が10ナノメートルから10マイクロメートルの部分の有していることを特徴とする請求項12に記載の微細金属構造体。
- [14] 前記微小突起物の高さ(H)に対する、前記微小突起物の相当直径(D)の比(H/D)が1より大きいことを特徴とする請求項12に記載の微細金属構造体。
- [15] 前記微小突起物が、非金属元素を副成分として含有する合金であることを特徴とする請求項12に記載の微細金属構造体。
- [16] 前記被覆層の表面に抗原、抗体、タンパク、塩基、糖鎖及び表面改質剤のうち少なくとも一種の有機物が固定化されていることを特徴とする請求項12に記載の微細金属構造体。
- [17] 前記被覆層を構成する材料が金であることを特徴とする請求項12に記載の微細金属構造体。
- [18] 表面に微細な凸凹パターンを有する基板の表面に、分子性無電解めっき触媒を付与し、その後に無電解めっきを施すことにより少なくとも前記凸凹パターンが充填された金属層を形成し、さらに、前記金属層を前記基板から剥離することにより前記凸凹パターンが反転転写された表面を有する微細金属構造体を得ることを特徴とする微細金属構造体の製造方法。
- [19] 請求項18に記載の製造方法で微小金属構造体を製造した後に、前記微小金属構造体の表面に、前記微小金属構造体を構成している成分と異なる成分からなる、少なくとも一層の被覆層を形成することを特徴とする微細金属構造体の製造方法。
- [20] 請求項18に記載の製造方法で微小金属構造体を製造した後に、前記金表面の少なくとも一部分に抗原、抗体、タンパク、塩基、糖鎖及び表面改質剤のうち少なくとも一種の有機物を固定化することを特徴とする微細金属構造体の製造方法。
- [21] 請求項18に記載の微細金属構造体の製造方法にあつて、前記微細構造体の凹凸表面形状の少なくとも一部が柱状構造からなり、前記柱状構造の直径あるいは一辺が10ナノメートルから10マイクロメートルあり、かつ柱状構造の高さ(H)に対する直

径あるいは一辺の長さ(D)の比( $H/D$ )が1より大きいことを特徴とする、微細金属構造体の製造方法。

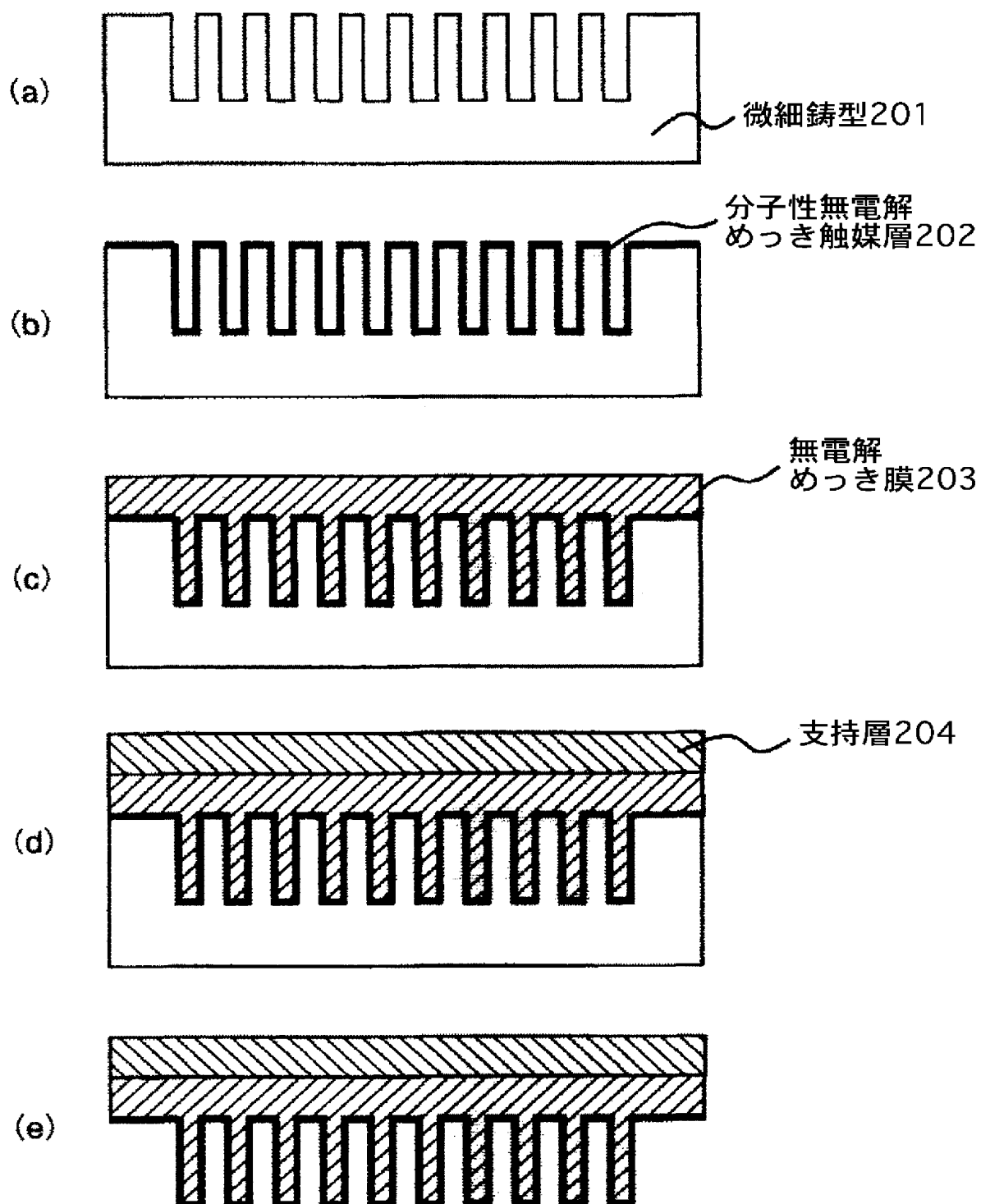
- [22] 樹脂や無機物を加圧成形するのに用いる金型にあって、前記金型の表面が請求項1に記載された微細金属構造体であることを特徴とする金型。
- [23] 微細金型を用いて樹脂や無機物を加圧成形するナノインプリント装置にあって、前記微細金型の表面が請求項1に記載された微細金属構造体であることを特徴とするナノインプリント装置。
- [24] 電気化学反応により物質を変換、製造あるいは検出する電極にあって、前記電極の少なくとも表面の一部が、請求項1に記載された微細金属構造体からなることを特徴とする電極。
- [25] 検体の検出部に微細な凸凹形状を有するマイクロチップにあって、前記検出部に請求項1に記載された微細金属構造体を用いたことを特徴とするマイクロチップ。
- [26] 基板の表面に検体と相互作用を及ぼしあう物質が固定化されたマイクロチップにあって、前記基板として請求項1に記載された微細金属構造体を用いたことを特徴とするマイクロチップ。
- [27] 基板の表面に多種類のDNAが固定化されたDNAチップにあって、前記基板として請求項1に記載された微細金属構造体を用いたことを特徴とするDNAチップ。



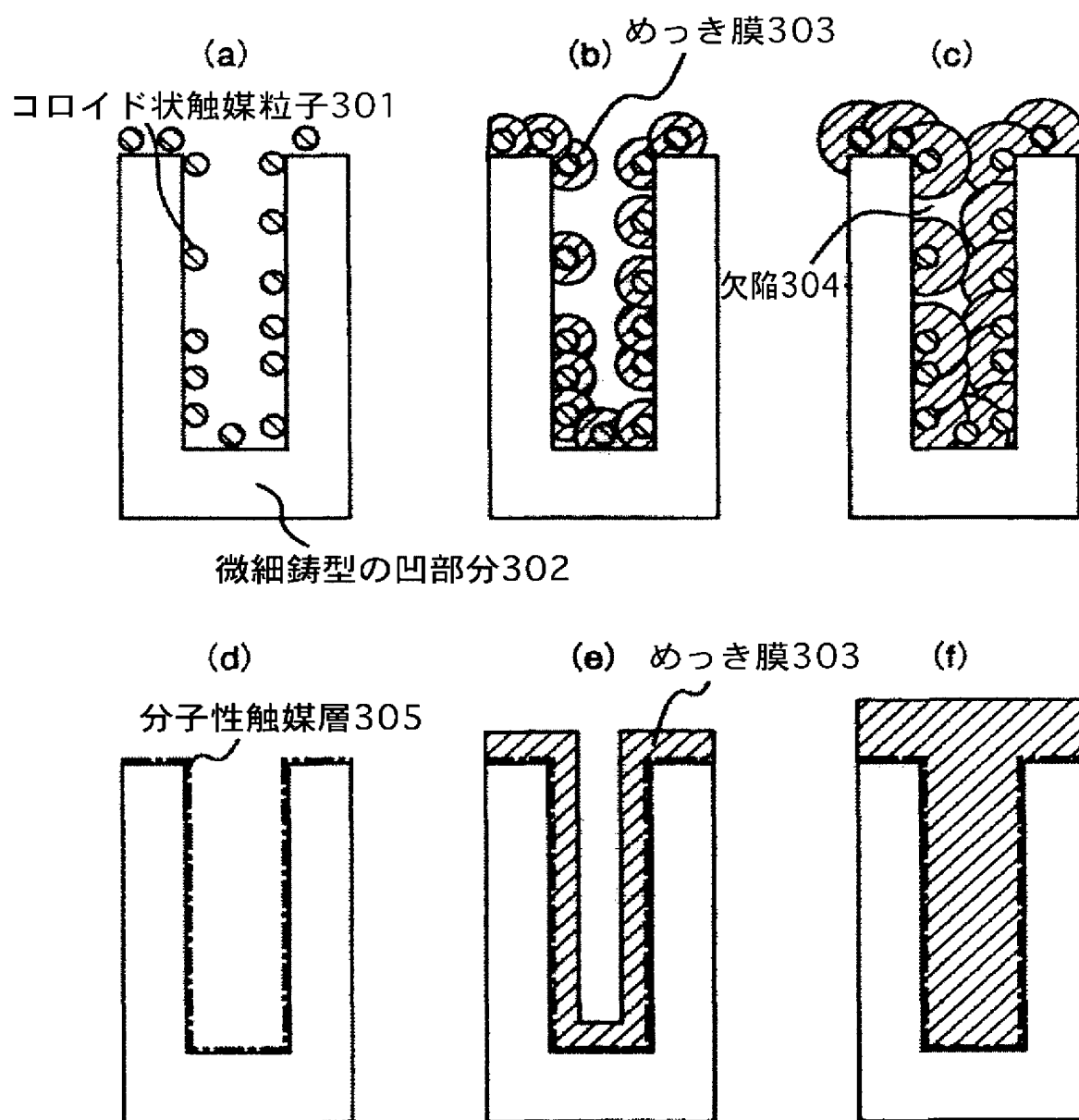
[図1]



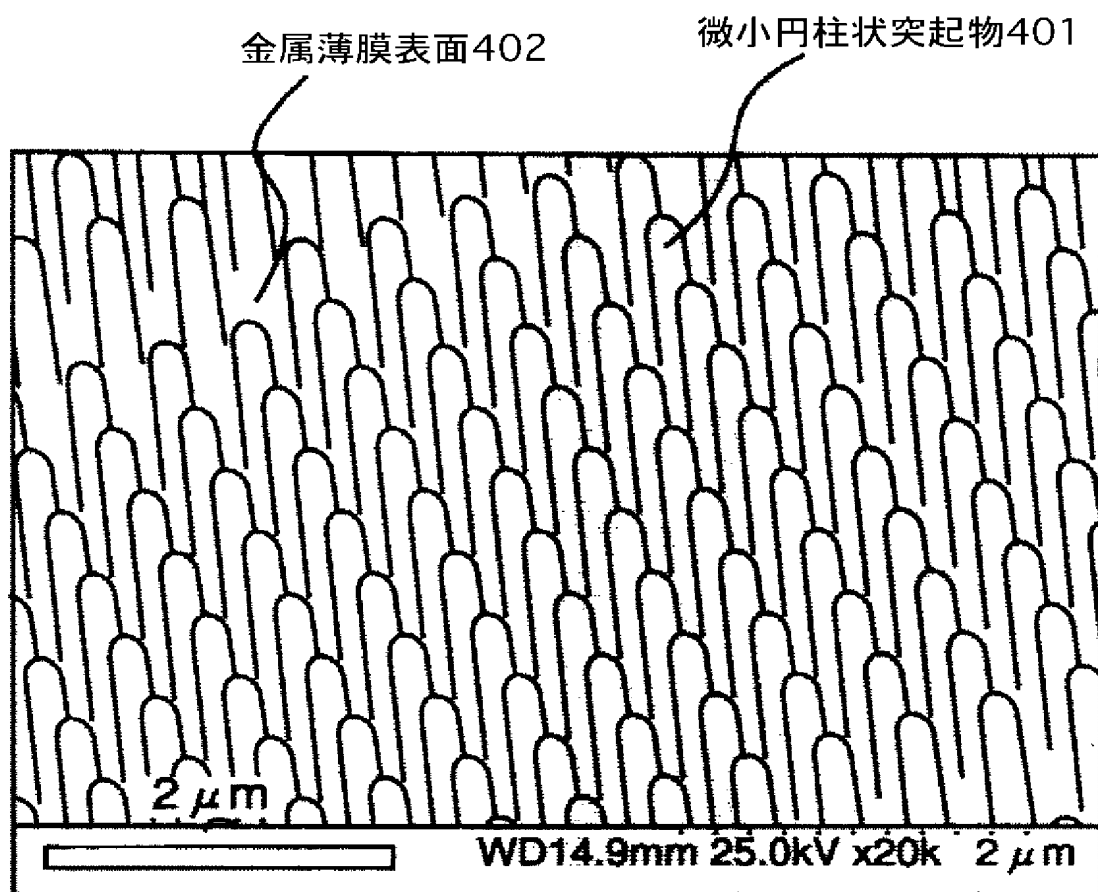
[図2]



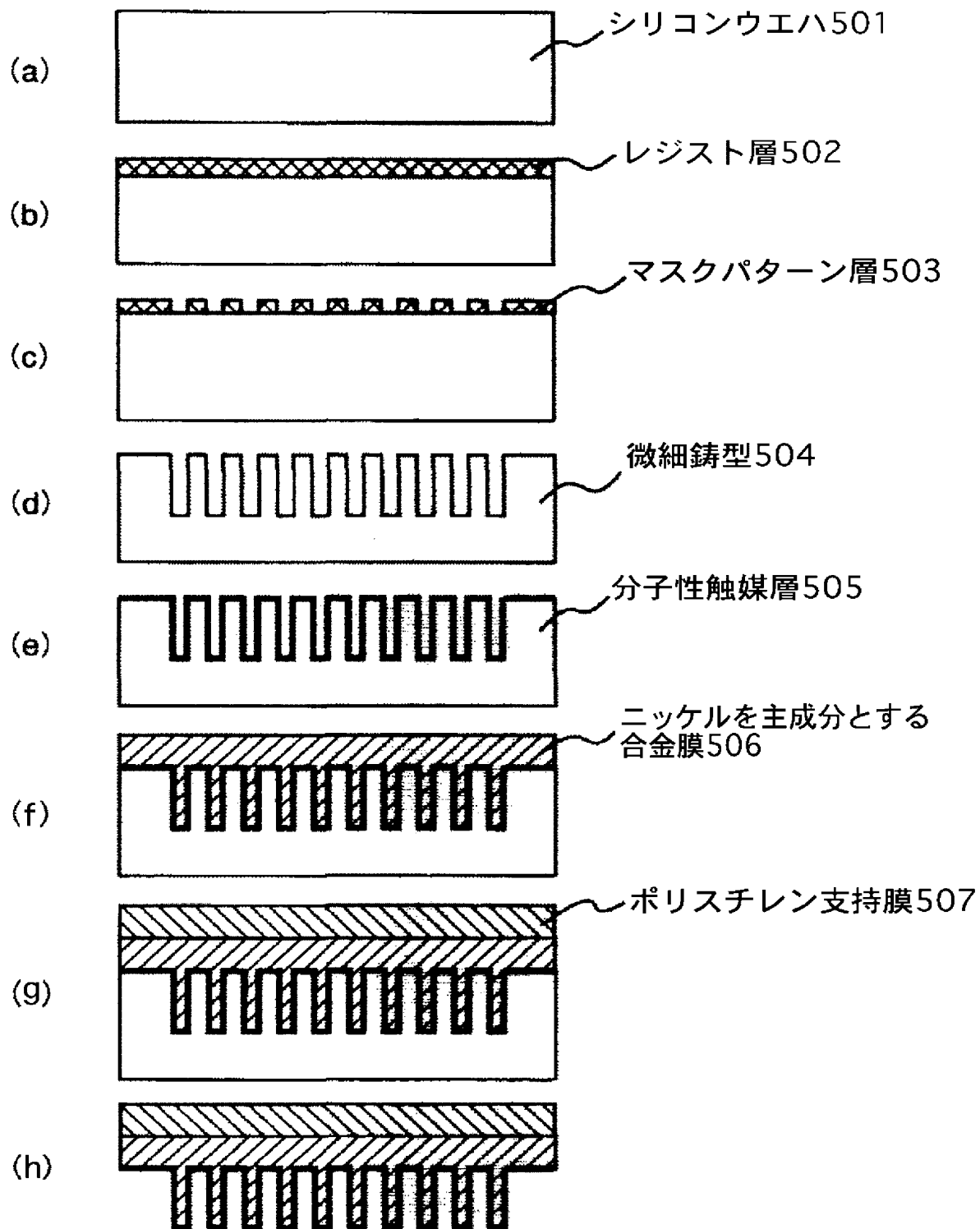
[図3]



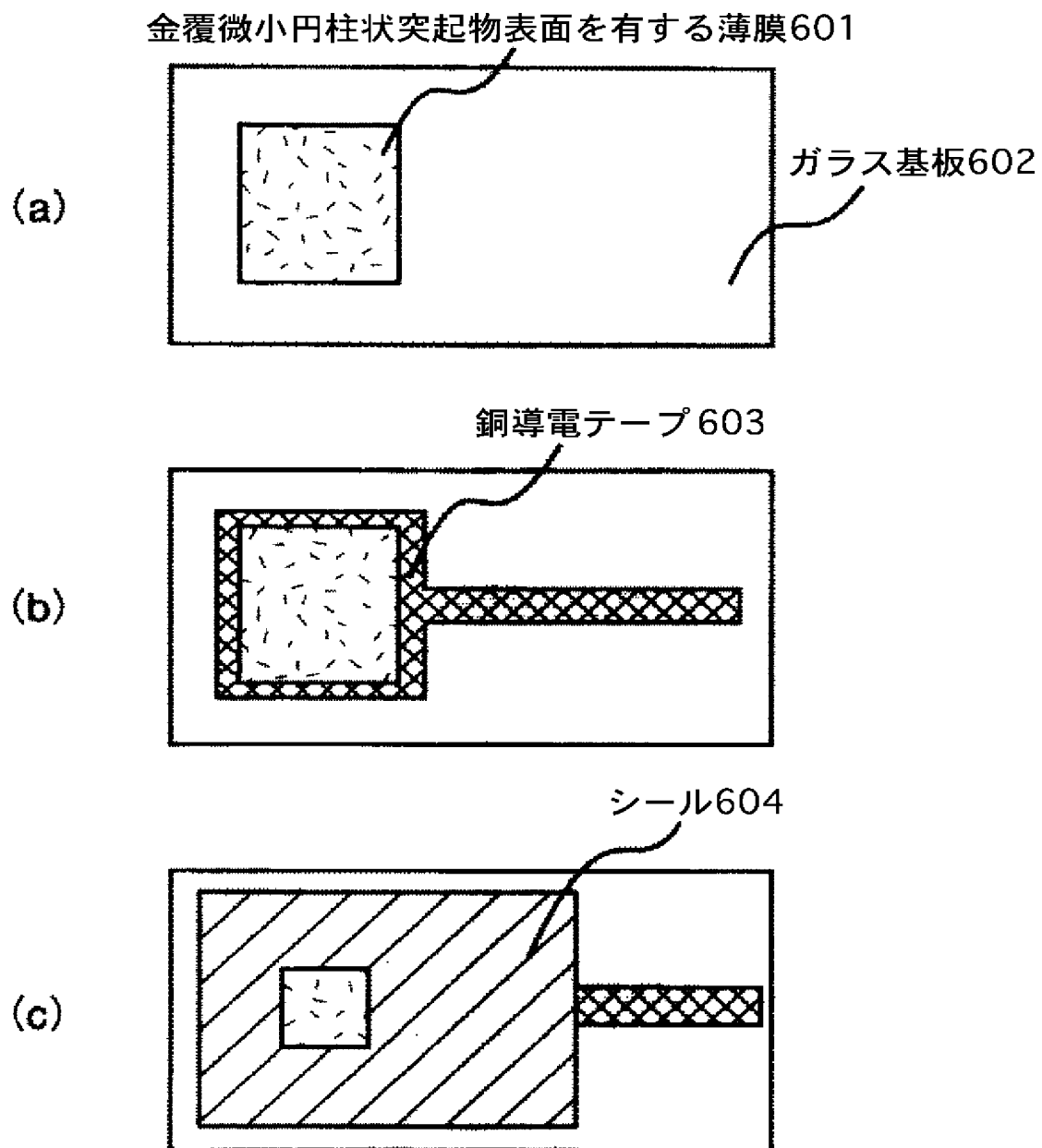
[図4]



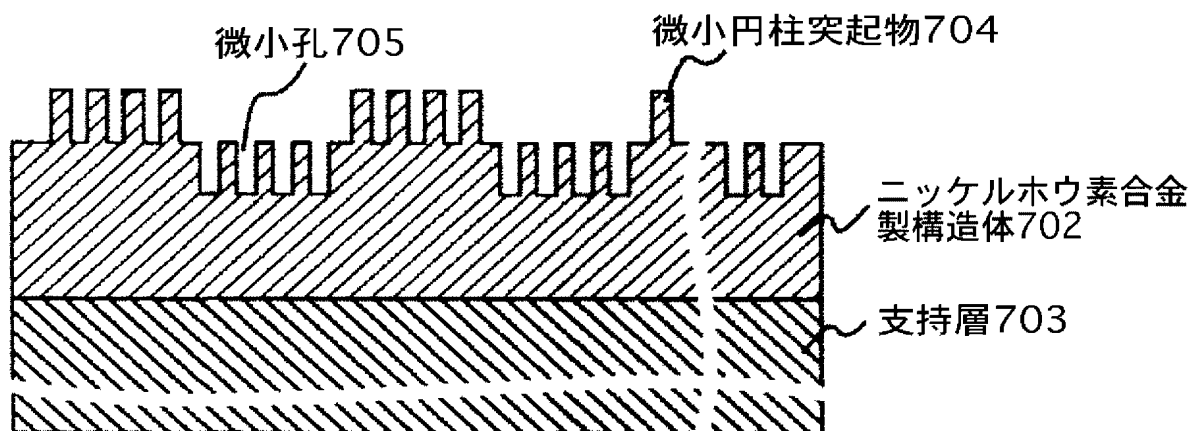
[図5]



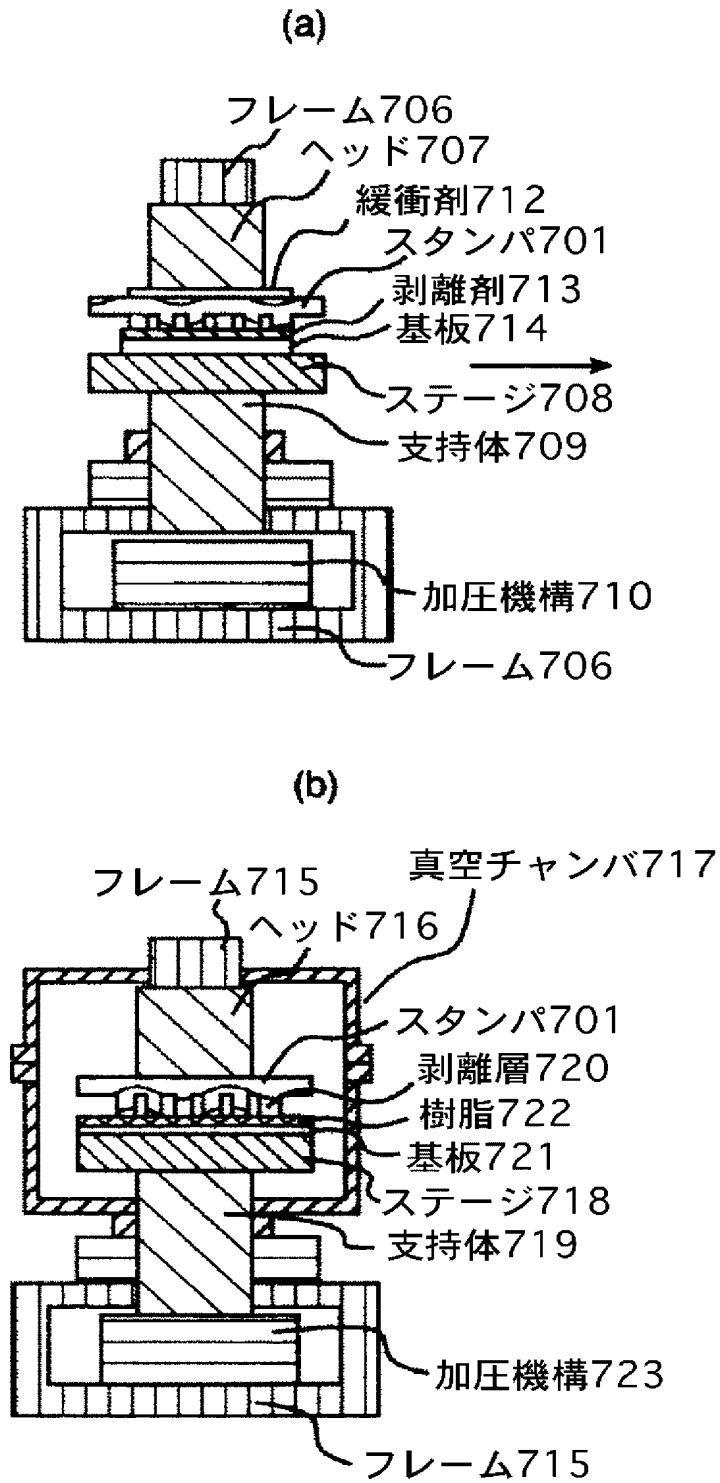
[図6]



[図7]

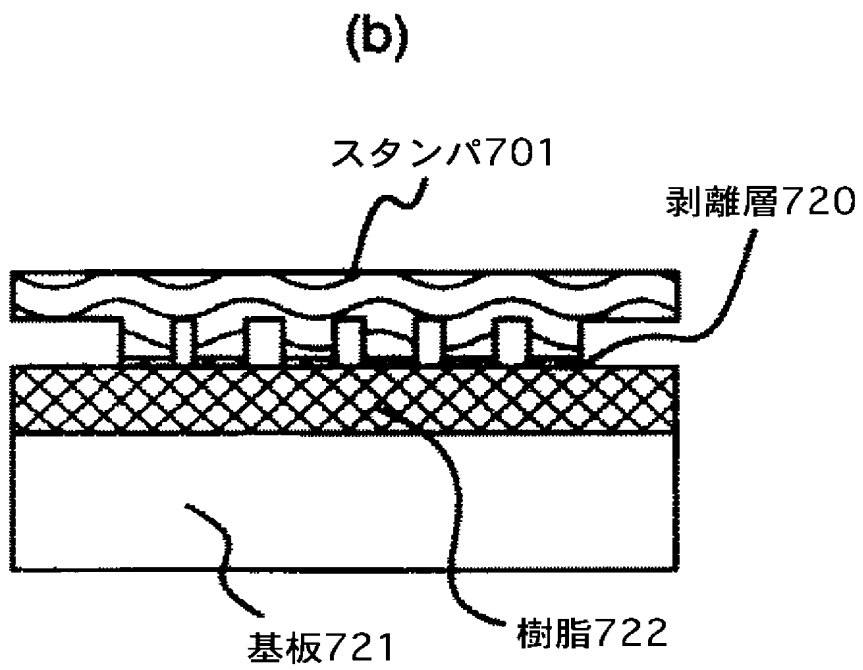
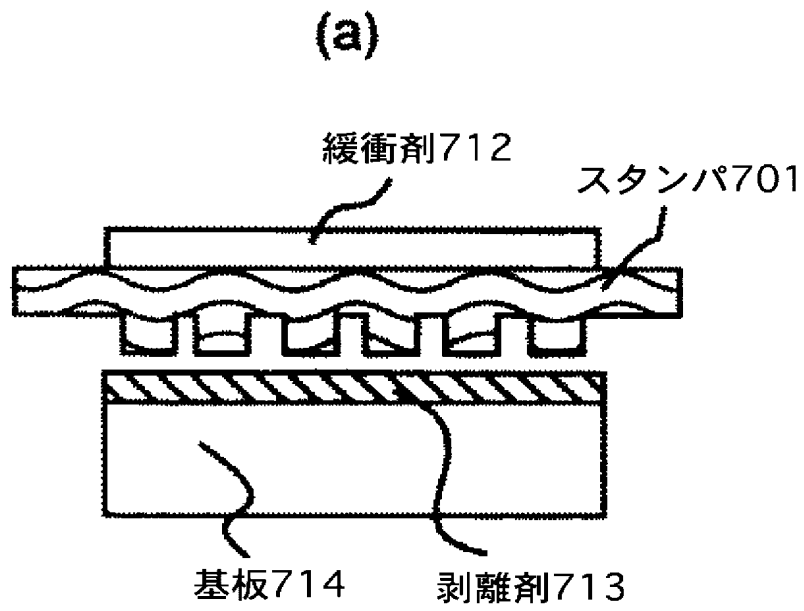


[図8]

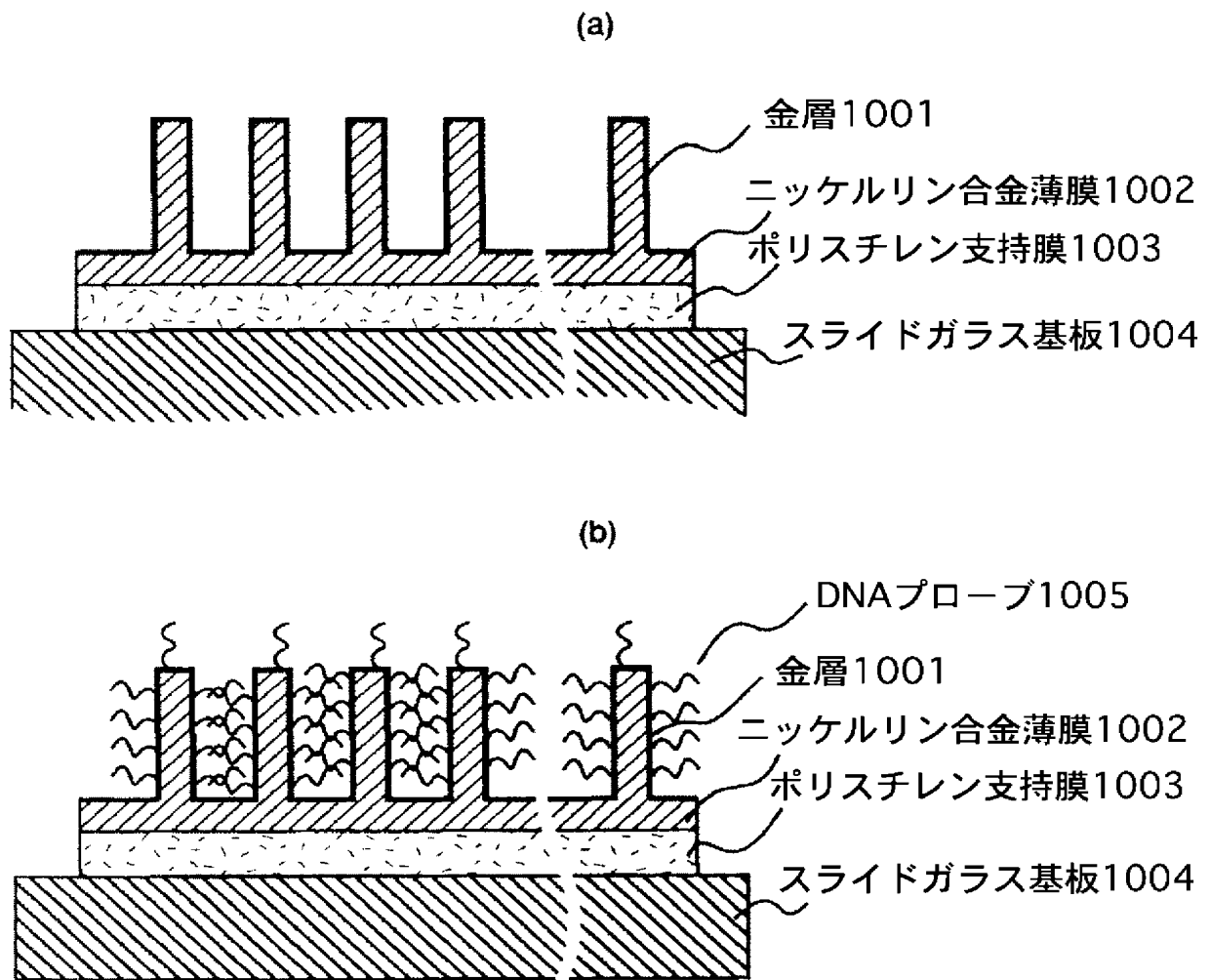




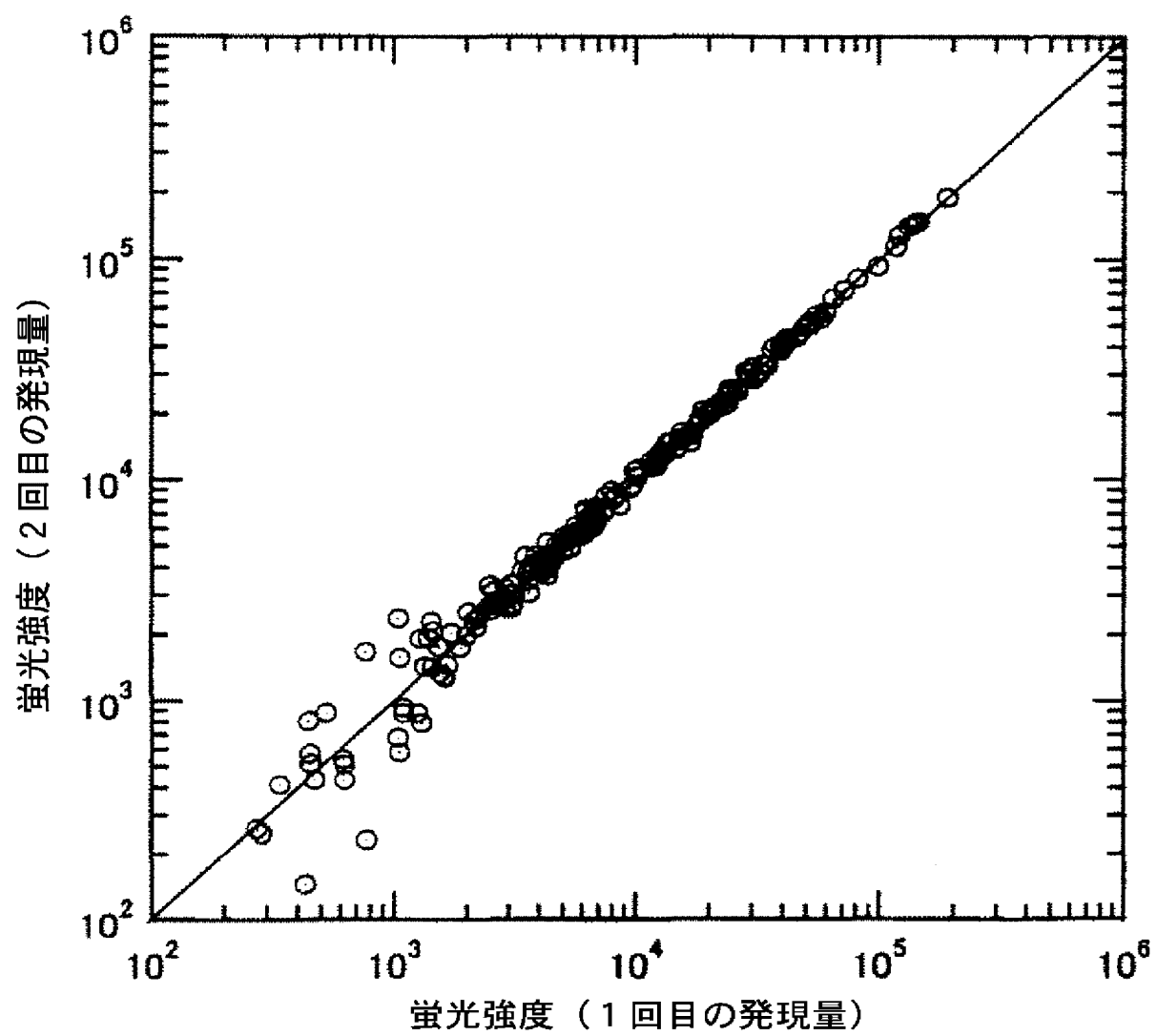
[図9]



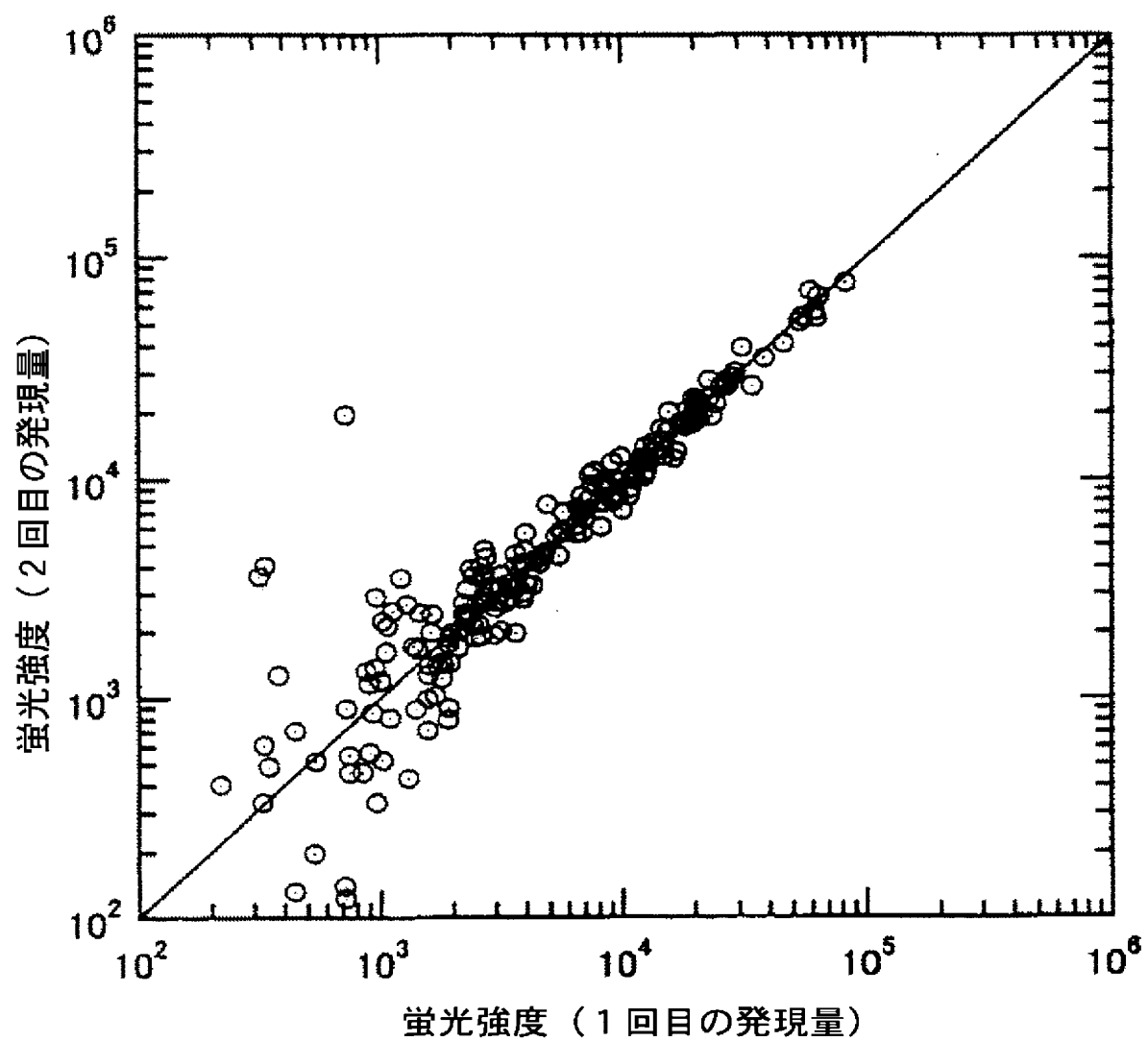
[図10]



[図11]



[図12]



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/019116

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> B81B1/00, B29C33/38, B81C1/00, B82B1/00, 3/00, H01L21/027

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> B81B1/00, B29C33/38, B81C1/00, B82B1/00, 3/00, H01L21/027

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2005
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2005	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2005

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2002-219587 A (Vacuum Metallurgical Co., Ltd.), 06 August, 2002 (06.08.02), Par. Nos. [0002], [0010] (Family: none)	1
A	JP 2001-29761 A (Atene Kabushiki Kaisha), 06 February, 2001 (06.02.01), Full text (Family: none)	1

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
12 April, 2005 (12.04.05)

Date of mailing of the international search report  
26 April, 2005 (26.04.05)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2004/019116

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The invention of claim 1 relates to microprojections having an aspect ratio of greater than 1.

The invention of claims 2 and 3 relates to microprojections of an alloy containing a nonmetallic element as an accessory component.

The invention of claim 4 relates to a fine metal structure comprising microprojections having their surface furnished with a single coating layer.

The invention of claim 5 relates to a fine metal structure comprising microprojections having, immobilized directly or indirectly on surfaces thereof, at least one organic matter selected from among an antigen, an antibody, a protein, a base, (continued to extra sheet)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/019116

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

a sugar chain and a surface modifier.

The invention of claims 6-11 and 18-21 relates to a process comprising providing a substrate having a fine rugged pattern on its surface, applying a molecular electroless catalyst to the surface, thereafter carrying out electroless plating to thereby form a metal layer, and detaching the metal layer from the substrate to thereby attain reversal transfer of the rugged pattern.

The invention of claims 12-17 relates to having at least part of the surface of microprojections furnished with at least one coating layer constituted of a component different from that constituting the microprojections.

The invention of claim 22 relates to a metal mold.

The invention of claim 23 relates to a nanoimprinting device.

The invention of claim 24 relates to an electrode.

The invention of claim 25 relates to a microchip having a detection part furnished with minute projections.

The invention of claim 26 relates to a microchip having, immobilized on the surface of the substrate thereof, a substance capable of interacting with an analyte.

The invention of claim 27 relates to a DNA chip.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.<sup>7</sup> B81B1/00, B29C33/38, B81C1/00, B82B1/00, 3/00, H01L21/027

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.<sup>7</sup> B81B1/00, B29C33/38, B81C1/00, B82B1/00, 3/00, H01L21/027

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2005年
日本国実用新案登録公報	1996-2005年
日本国登録実用新案公報	1994-2005年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	J P 2002-219587 A (真空冶金株式会社) 2002.08.06, 段落【0002】, 【0010】 (ファミリーなし)	1
A	J P 2001-29761 A (アテネ株式会社) 2001.02.06, 全文 (ファミリーなし)	1

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

12.04.2005

国際調査報告の発送日

26.4.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

塩澤 正和

電話番号 03-3581-1101 内線 3364

3 P

3319



## 第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。  
つまり、
2. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1に係る発明はアスペクト比が1より大きい微小突起物に関するものである。

請求の範囲2, 3に係る発明は、微小突起物が非金属元素を副成分として含有する合金であるものに関するものである。

請求の範囲4に係る発明は、微小突起物の表面が、一層の被覆層により被覆されている微小金属構造体に関するものである。

請求の範囲5に係る発明は、微小突起物の表面に直接あるいは間接的に抗原、抗体、タンパク、塩基、糖鎖及び表面改質剤のうち少なくとも一種の有機物が固定化されている微細金属構造体に関するものである。

請求の範囲6-11, 18-21に係る発明は、微細な凹凸パターンを有する基板の表面に分子性無電解触媒を付与し、無電解めっきにより形成された金属層を該基板から剥離し該凹凸パターンを反転転写することに関するものである。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

請求の範囲1

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☒ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

請求の範囲12-17に係る発明は、微小突起物の表面の少なくとも一部分が、前記微小突起物を構成している成分と異なる成分からなる、少なくとも一層の被覆層により被覆することに関するものである。

請求の範囲22に係る発明は金型に関するものである。

請求の範囲23に係る発明は、ナノインプリント装置に関するものである。

請求の範囲24に係る発明は、電極に関するものである。

請求の範囲25に係る発明は、検出部に微小な突起を有するマイクロチップに関するものである。

請求の範囲26に係る発明は、基板の表面に検体と相互作用を及ぼしあう物質が固定化されたマイクロチップに関するものである。

請求の範囲27に係る発明は、DNAチップに関するものである。